

UNTERSUCHUNGEN ÜBER STEROID-MAKROMOLEKÜL- WECHSELWIRKUNGEN

Harald Hötzing

1977



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41553812_0074

Aus der I. Frauenklinik und Hebammenschule der
Universität München
Direktor: Prof. Dr. Josef Zander

UNTERSUCHUNGEN ÜBER STEROID-MAKROMOLEKÜL-WECHSEL-
WIRKUNGEN

I

Dissoziationsgeschwindigkeiten der Komplexe von
Anti-Östrogen-C6-Konjugat-Antikörpern mit mar-
kierten Östrogenen

II

Dissoziationsgeschwindigkeiten der Komplexe von
Anti-Östrogen-C6-Konjugat-Antikörpern mit unmar-
kierten Östrogen-C6-Derivaten

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten
Medizin an der Ludwig-Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt von
Harald Hötzing
aus

Salmanskirchen
Jahr

1977

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der
Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Erich Kuss

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Josef Zander

Dekan: Prof. Dr. Wolfgang Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 22. Dezember 1977



INHALTSVERZEICHNIS

EINLEITUNG

I DISSOZIATIONSGESCHWINDIGKEITEN DER KOMPLEXE VON ANTI-ÖSTROGEN-C6-KONJUGAT-ANTIKÖRPERN MIT MARKIERTEN ÖSTROGENEN

1. Grundlagen

2. Material und Methoden

3. Ergebnisse

3.1 Reaktionsgleichgewicht

3.2 Einfluß der Kompetitormenge und der Nachinkubationsdauer

3.3 Einfluß der Bestimmungsmethoden

3.4 Darstellung der Dissoziation von Hapten-Antikörper-Komplexen

3.4.1 Darstellung des Verlaufs der Dissoziation

3.4.2 Einfluß der Haptenkonzentration bei verschiedenen Temperaturen

3.4.3 Einfluß von Antiserumbestandteilen: Vergleich von Antiseren mit Gamma-Globulin-Fraktionen

3.4.4 Einfluß der Temperatur

3.4.5 Aktivierungsenergie der Dissoziationsreaktion

4. Diskussion

4.1 Diskussion der Versuchsmethodik

4.1.1 Assoziation von Hapten und Antikörper

4.1.2 Dissoziation des Hapten-Antikörper-Komplexes

4.1.3 Verhinderung der Reassoziaton

4.1.4 Trennung von gebundenem und freiem Hapten

4.2 Diskussion der Meßwerte

4.2.1 Verlauf der Dissoziation

4.2.2 Einfluß der Hapten-Konzentration

4.2.3 Einfluß des Antigens und des antikörper- produzierenden Tieres

II DISSOZIATIONSGESCHWINDIGKEITEN DER KOMPLEXE VON ANTI-ÖSTROGEN-C6-KONJUGAT-ANTIKÖRPERN MIT UNMARKIER- TEN ÖSTROGEN-C6-DERIVATEN

1. Grundlagen

2. Material und Methoden

3. Ergebnisse

4. Diskussion

4.1 Diskussion der Methode

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 Einfluß der Haptenstrukturen

4.2.2 Einfluß der Reaktionstemperatur; Aktivie- rungsenergie der Dissoziation

4.3 Vergleich mit Ergebnissen anderer Autoren

ZUSAMMENFASSUNG

LITERATUR

ANHANG

DANKVERMERK

LEBENS LAUF

EINLEITUNG

Immunologische Affinität und Spezifität sind Folgen der molekularen Komplementarität zwischen Strukturelementen der bindenden Region des Antikörpers und der Immundeterminante des korrespondierenden Antigens (und der ihr strukturell ähnlichen Haptene). Die Ausdehnung der bindenden Region von Antikörpern ist noch immer unklar, obwohl bereits Ergebnisse physikalischer Strukturanalysen einiger Immunglobuline vorliegen (1).

Der klassische immunchemische Weg zur Bestimmung der Größe der bindenden Region führte über Bindungsstudien. Sie wurden von Kabat mit Anti-Dextran-Antikörpern durchgeführt und es wurden Haptene eingesetzt, die steigende Mengen von Strukturelementen der Immundeterminante enthielten, wie Monosaccharide, Disaccharide, Trisaccharide und größere Oligosaccharide (2). Analoge Untersuchungen an Anti-Peptid-Antikörpern wurden mit den entsprechenden Peptiden durchgeführt (3). Bei der Diskussion der Ergebnisse wurde als nachteilig herausgestellt, daß die Konformation der Oligosaccharide und -peptide in wäßriger Lösung unbekannt ist und daß dies die Eignung der Substanzen als molekulare Sonden beeinträchtigt. 1973 wurde die Meinung vertreten, daß

steroidale Haptene auf Grund ihrer rigiden Struktur und ihrer etwa der bindenden Region von Antikörpern entsprechenden Größe als Sonden zur Charakterisierung von Antikörpern geeignet seien (4).

Antisteroid-Antikörper werden von Immunogenen induziert, deren Struktur in drei Bereiche unterteilt werden kann: Immundeterminante, Brückenregion und Rest des Moleküls. Als Brückenregion wird der Teil des Immunogens bezeichnet, der die Verbindung zwischen Immundeterminante und dem Rest des Moleküls bildet. Das in Abbildung 1 dargestellte Östrogen-C6-Carboxymethoxim-Albumin besitzt sicherlich als Immundeterminante den Ring D, der über das Steroid-Gerüst und die 6-Carboxymethoxim-Region mit der ϵ -Aminogruppe der Lysin-Reste des Albumins verbunden ist. Es stellte sich die Frage, wie weit die Region der Immundeterminante reicht, ob z.B. das C-Atom 6 eines steroidal Haptens vom gleichen Antikörper erkannt wird, der auch Ring-D komplementäre Strukturen besitzt (Abb.2).

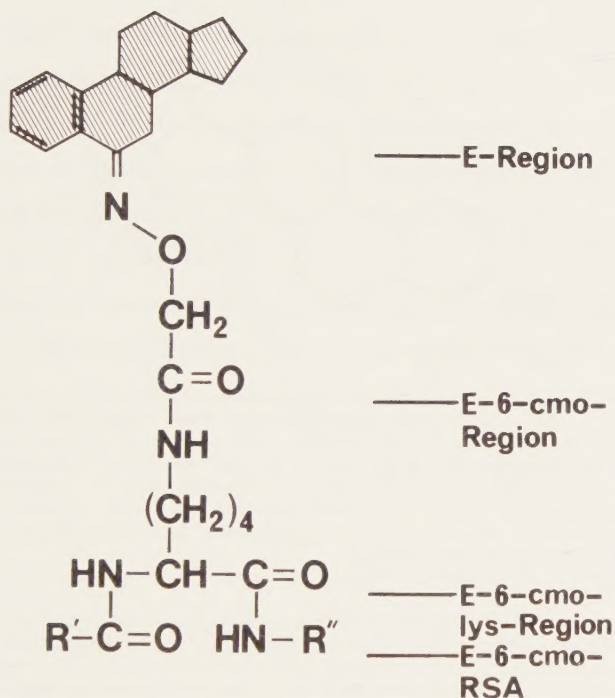


Abb. 1 Schematische Darstellung eines Immunogens: substituiertes Östrogen als Immundeterminante mit einem Carboxymethoxim-Glied als Brücke zur ϵ -Aminogruppe eines Lysins des Trägermoleküls Rinderserum-Albumin (RSA)

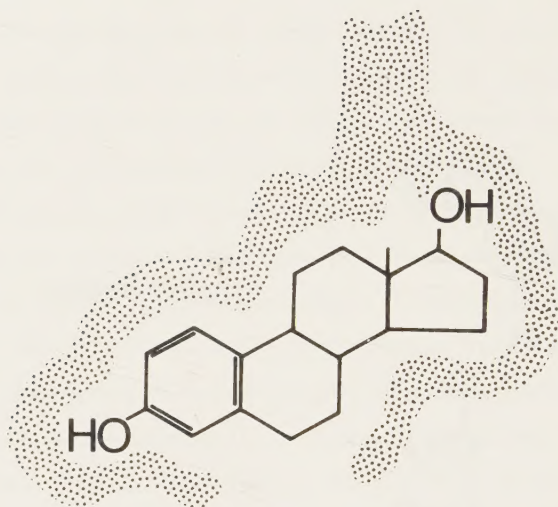


Abb. 2 Schematische Darstellung der bindenden Region eines Antikörpers, der durch einen in Abb.1 dargestellten Immunogen-Typ induziert worden ist und eines gebundenen Östradiol-Moleküls

Die Beantwortung der Frage, wie weit die bindende Region eines Antikörpers das korrespondierende Hapten umschließt, ist von allgemeinem Interesse für das Verständnis immunchemischer Reaktionen. Speziellere Interessen werden diesem Problem deswegen entgegengebracht, weil die hier untersuchten Antikörper-Typen (Anti-Östrogen-C6-Konjugat-Antikörper) zur radioimmunologischen Bestimmung von biogenen Östrogenen bevorzugt verwendet werden. Hierbei könnten ^{125}J -markierte Östrogen-C6-Carboxymethoxim-Derivate vorteilhaft als Indikator-Haptene verwendet werden. Diese Haptene werden aber

zu Antikörpern, die das Steroid und das Brückenglied erkennen, größere Affinitäten besitzen als die biogenen Steroide, die kein Element des Brückengliedes enthalten. Wenn aber bei radioimmunologischen Bestimmungen die Assoziationskonstante K^x des Indikator-Haptens größer ist als die Assoziationskonstante K des zu bestimmenden Haptens, setzt dies die Empfindlichkeit der analytischen Methode wesentlich herab oder macht die Bestimmung unmöglich (5).

In früheren Experimenten war versucht worden, die Grösse der bindenden Region von Anti-Östrogen-C6-Konjugat-Antikörpern über die Hemmung der Bindung eines Indikator-Haptens (^3H -Östrogen) durch Östrogen-C6-Derivate zu bestimmen. Je kleiner die Dosis ist, die von einem Östrogen-C6-Derivat benötigt wird, um die Bindung des Indikator-Haptens im Reaktionsgleichgewicht auf ein bestimmtes Maß zu reduzieren, umso größer ist die Affinität dieses Östrogen-C6-Derivates zu der gegebenen Antikörperpopulation. Da die Strukturen der Östrogen-C6-Derivate bis auf ihre C6-Substituenten mit der Struktur des Indikator-Haptens ^3H -Östrogen identisch waren, sollte aus den Inhibitionsdosen auf die Größe der vom Antikörper "erkannten" C6-Region geschlossen werden. Die Ergebnisse zeigten, daß die Affinität der Antikörper zu Östradiol-6-oxo deutlich größer ist als zu Östradiol. Über die Affinitäten zu Östradiol-Derivaten mit längeren Anteilen des C6-Brückengliedes wie z.B. zu O-Me-

thyläther des Östradiol-C6-oxims oder zum Hippuryl-Lysin-Derivat des Östradiol-C6-carboxymethoxims konnten keine eindeutigen Aussagen gemacht werden (6,7), da die Kompetitionskurven der Haptene nicht parallel zueinander verliefen, sondern überlappend. Deswegen wurde zur Beantwortung der Frage, ob und wie weit Anti-Steroid-Antikörper Brückenglieder erkennen, die Dissoziationsgeschwindigkeit der Komplexe von Anti-Östradiol-C6-Konjugat-Antikörpern mit C6-substituierten Östradiol-Derivaten untersucht. Dissoziations-Geschwindigkeitskonstanten gelten als Maß der Komplexstabilität. Sie charakterisieren die Passung zwischen Ligand und bindender Region des Makromoleküls. Ihre Ermittlung ergänzt die Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten K_{ass} , deren Größe sowohl von k_{12} , der Assoziations-, als auch von k_{21} , der Dissoziations-Geschwindigkeitskonstante abhängt $K_{ass} = \frac{k_{12}}{k_{21}}$.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, die Dissoziationsgeschwindigkeit von Hapten-Antikörper-Komplexen zu messen. Gute Ergebnisse werden durch die Relaxationsspektroskopie (8) erhalten. Als nachteilig müssen aber der große apparative Aufwand und die relativ hohen Konzentrationen an eingesetztem Material gelten.

Am gebräuchlichsten ist die Verwendung markierter Haptene, deren Konzentration auch in niederen Bereichen gemessen werden kann (9). In Teil I dieser Arbeit wurde die Dissoziationsgeschwindigkeit markierten Östrons,

Östradiols und Östriols vom Hapten-Antikörper-Komplex gemessen. Dabei wurden verschiedene Trennungsmethoden von gebundenem und freiem Hapten miteinander verglichen. Die Markierung aller interessierenden kreuzreagierenden Haptene ist jedoch zeitraubend, umständlich und manchmal unmöglich. Diese Schwierigkeit wurde von uns mit Hilfe der sequentiellen Inkubation (10) umgangen, die es ermöglicht, die Dissoziationsgeschwindigkeit unmarkierter Haptene zu messen. Hierüber wird in Teil II berichtet.

I

DISSOZIATIONSGESCHWINDIGKEITEN DER KOMPLEXE VON
ANTI-ÖSTROGEN-C6-KONJUGAT-ANTIKÖRPERN MIT MAR-
KIERTEN ÖSTROGENEN

1. Grundlagen

Die Hapten-Antikörper-Reaktion kann in grober Vereinfachung folgendermaßen dargestellt werden (11,12):



P: Hapten

Q: Antikörper

PQ: Hapten-Antikörper-Komplex

k₁₂: Assoziationsgeschwindigkeitskonstante

k₂₁: Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante

Gleichung (I) setzt Monovalenz und Homogenität von Antikörper und Hapten voraus. Die Dissoziationsgeschwindigkeit ergibt sich als Abfall der Konzentration von PQ mit der Zeit nach der Formel (II).

$$(PQ)_t = (PQ)_0 e^{-k_{21} t} \quad (II)$$

Sie wird charakterisiert durch die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k₂₁ und die Halbwertszeit.

Gleichung (II) kann in Gleichung (III) umgeformt werden.

$$\ln \frac{(PQ)_t}{(PQ)_0} = -k_{21} t \quad (III)$$

Diese Gleichung läßt erkennen, daß k₂₁ als Anstieg einer Geraden im ln(PQ)/t-Diagramm ermittelt werden kann. Zur experimentellen Bestimmung von k₂₁ muß also die Konzentration von (PQ) zu verschiedenen Zeiten gemessen werden. Dies ist bei Verwendung radioaktiver Haptene nicht schwierig, wenn man eine geeignete Methode zur

Trennung des freien Haptens vom Hapten-Antikörper-Komplex einsetzt. In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Verfahren angewendet.

1. Kompetitionsmethode. Blockierung der Re-assoziaton der Haptene durch Zugabe einer "unendlichen" Menge eines kompetitiven Inhibitors zur Zeit t_0 . Als Inhibitor wurde das gleiche, aber unmarkierte Hapten benutzt. Zur Trennung des freien Haptens vom Hapten-Antikörper-Komplex wurde

- a) das freie Hapten an Dextranskohle adsorbiert, oder
- b) der Hapten-Antikörper-Komplex mit Ammoniumsulfat gefällt.

2. Adsorptionsmethode. Momentane und irreversible Adsorption des freien und des während der Inkubationszeit dissoziierenden Haptens durch Zugabe von Dextranskohle zur Zeit t_0 .

2. Material und Methoden

Unmarkierte Haptene

3-Hydroxy-1,3,5(10)-Östratrien-17-on (Östron, E1);
 1,3,5(10)-Östratrien-3,17 β -diol (Östradiol-17 β , 17 β -E2);
 1,3,5(10)-Östratrien-3,16 α ,17 β -triol (17 β -E2-16 α -OH,
 Östriol, E3) wurden von E.Merck, Darmstadt,BRD bezogen.
 Stammlösungen wurden durch Lösen von 1,0 mg Hapten in
 10 ml Äthanol bereitet, die Konzentrationen wurden
 durch UV-Spektrophotometrie (Zeiss PMQ 2) geprüft und
 zu einer Endkonzentration von 1,0 mg/l verdünnt. Ar-
 beitslösungen wurden daraus gewonnen, indem definierte
 Volumina der Stammlösung unter einem Stickstoffstrom
 eingedampft wurden und der Rückstand über Nacht mit
 Phosphatpuffer (pH 7,2) gelöst wurde. Diese Arbeitslö-
 sungen (1,48 μ molSteroid/l) wurden bei 0-4°C aufbewahrt.
 Die Reinheit der Steroide wurde durch Dünnschichtchro-
 matographie überprüft.

Markierte Haptene

$\left[2,4,6,7 -^3\text{H}_4\right]$ -Östron (90 Ci/mmol), $\left[2,4,6,7 -^3\text{H}_4\right]$ -Östra-
 diol-17 β (90 Ci/mmol) und $\left[2,4,6,7 -^3\text{H}_4\right]$ -Östriol (90 Ci/
 mmol) wurden von NEN, Boston, Mass.,USA bezogen und bei
 -18°C in Methanol/Benzol gelagert. Die Reinheit wurde
 durch Papierchromatographie überprüft. Arbeitslösungen
 wurden durch Eindampfen eines bestimmten Volumens der
 Stammlösung unter Stickstoff und Lösung des Rückstandes
 in Phosphatpuffer (pH 7,2) bereitet. Von allen markier-
 ten Haptenen wurden Pufferlösungen folgender Konzentra-

tionen verwendet: 0,37, 3,70 und 11,10 nmol/l.

Andere Reagentien

Dextran T 70 von Pharmacia, Uppsala, Schweden; Norit A (4-5 μ m) von Serva, Heidelberg, BRD; Rinderserumalbumin (RSA) von der Behringwerke AG, Marburg, BRD; Bio-Solv (BBS 3) von Beckman Instruments GmbH, München, BRD; 2,5-Diphenyloxazol (PPO) und 1,4-bis-2-(4-methyl-5-phenyloxazolyl)benzol (POPOP) von W. Zinsser, Frankfurt, BRD; Phosphatpufferlösungen 1/15 mol/l mit 5 mmol/l NaN_3 pH 7,2. Wässrige Lösungen wurden mit "aqua pro injectione" B.Braun, Melsungen, BRD bereitet.

Dextrankohle

0,5 g Norit A, 0,05 g Dextran und 100 ml Phosphatpuffer (pH 7,2) wurden vor Gebrauch mindestens 4 Tage gerührt, anschließend wurde die Kohle dauernd weitergerührt.

Ammoniumsulfatlösung (13)

Eine Stammlösung gesättigten Ammoniumsulfats wurde zubereitet und bei Raumtemperatur aufbewahrt. Die gewünschten Konzentrationen wurden durch Mischung mit den Reaktionslösungen hergestellt.

Scintillationszählung

100 g PPO und 1,25 g POPOP wurden in 1 l Toluol gelöst. 42 ml dieser Lösung und 117 ml Bio-Solv (BBS 3) wurden zu 1 l Toluol gegeben. Die Scintillationszählung wurde mit 15 ml dieser Mischung in einem Packard Modell 2425 durchgeführt. Gezählt wurde 4-10 min lang, so daß die Standardabweichung bei 1000 cpm 0,5%, bei höheren Wer-

ten niedriger war. Die Zählausbeute für ^3H betrug 32%.

Immunisierung (4,14)

Kaninchen wurden gegen Östron, Östradiol-17 β und Östriol immunisiert. Als Antigene wurden Östron-, Östradiol-17 β - und Östriol-C6-Albuminkonjugate verwendet. 2 mg Antigen in 0,4 ml 0,01 Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)-puffer (pH 7,5) (5 mmol/l NaN_3) wurden mit dem gleichen Betrag von komplettem Freundsschen Adjuvans emulgiert. Zur Immunisierung wurden 0,2 ml der Emulsion in jede der vier Pfoten gespritzt.

Nach drei Wochen wurde die erste Boosterung durchgeführt, indem 2 mg Antigen in der beschriebenen Pufferlösung mit dem gleichen Betrag von inkomplettem Freundsschen Adjuvans emulgiert, die Emulsion in vier gleiche Volumina geteilt und zwei i.m. und zwei s.c. injiziert wurden. Die zweite Boosterung erfolgte eine Woche später auf diesselbe Art.

Blutentnahme

Blut wurde aus der Ohrvene der Kaninchen entnommen; die erste Probenahme eine Woche nach der zweiten Boosterung, die folgenden im Abstand von jeweils einer Woche. Aufbewahrung: Die Blutproben wurden nach der Gerinnung zentrifugiert und bei -20°C aufbewahrt.

Gamma-Globulin-Fraktion

Gleiche Volumina Antiserum und 70%ig-gesättigte Ammoniumsulfatlösung wurden miteinander vermischt (13), so daß eine 35%ig-gesättigte Ammoniumsulfatlösung ent-

stand (pH 7,2-7,6). In dieser Lösung fallen die Gamma-Globuline bei Zimmertemperatur innerhalb 4 Stunden aus. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen, der Niederschlag in destilliertem Wasser aufgenommen und dann das gleiche Volumen 70%ig-gesättigte Ammoniumsulfatlösung zugegeben. Auf diese Weise wurde eine dreimalige Fällung vorgenommen. Anschließend wurden die Fraktionen gegen eine 0,85%ige NaCl-Lösung (pH 8,0) bei 4°C dialysiert, bis kein Sulfat mehr im Dialysat war. Das Dialysat wurde als Stammlösung für die Gamma-Globulin-Lösungen verwendet, nachdem das Volumen mit destilliertem Wasser auf das Ausgangsvolumen des Antiserums gebracht worden war.

Antiseren

Anti-Östron-(Anti-E1-AS), Anti-Östradiol-17 β -(Anti-E2-AS) und Anti-Östriol- (Anti-E3-AS)- Antiseren und die aus diesen Seren mit Ammoniumsulfat gefällten Gamma-Globulin-Fraktionen (Anti-E-G) wurden vom Laboratorium zur Verfügung gestellt. Tab.1 zeigt eine Charakteristik der verwendeten Antiseren. Mit Phosphatpufferlösung (pH 7,2) wurden jeweils die Proteinkonzentrationen der Arbeitslösungen eingestellt. Sie waren soweit verdünnt worden, daß 0,1 ml Arbeitslösung im Ansatzvolumen von 1,2 ml 50% von 0,76 pmol markiertem Steroid band. Ein Vergleich mit Serum eines nicht immunisierten Kaninchens ergab eine Bindung von 6,5% des zugegebenen markierten Steroids.

Antikörper	Konzentration der Bindungsstellen in der Ansatzlösung in nmol/l bei 15°C		
	Ig G Fraktion		Antiserum
	(nach Link)		(abgeschätzt)
	q	$K \times 10^{-9}$ lmol^{-1}	q
Anti-E2-17B			
D2 441	0,5	5,7	0,65
E2 443	0,85	3,7	1,1
F2 451	2,95	0,7	5,2
Anti-E1			
H2 450	4,3	0,8	6,0
I2 453	5,6	1,5	8,8
K2 454	6,9	0,7	7,6
Anti-E3			
H2 457	1,2	1,0	1,25
I2 449	1,9	1,1	1,9
K2 456	1,3	0,9	1,3

Tab.1 Charakteristik der Antiseren. Die immunisierten Kaninchen sind mit Großbuchstaben bezeichnet, der Index bezieht sich auf die Blutabnahme, die Zahl auf die Nummerierung im Tierstall.

Inkubationen

Die Inkubationen wurden bei 5,15,25 und 35°C durchgeführt. 0,2 ml der Arbeitslösung des markierten Haptens (0,074-2,22 pmol) und 0,1 ml Arbeitslösung Kaninchen-serum (Antiserum- oder Gamma-Globulinlösung, Kontroll-

serum) wurden in ein Reaktionsgefäß (1,5 ml, Eppendorf Gerätebau, Hamburg, BRD) pipettiert. Mit Phosphatpufferlösung (pH 7,2) wurde ein Volumen eingestellt, das 1,0 ml betrug, wenn die Inkubation mit Dextranskohle, 0,78 ml, wenn sie mit Ammoniumsulfat beendet wurde.

1. Untersuchung der Assoziationsreaktion:

Um ein Ansatzvolumen von 1,2 ml zu erreichen, wurde 0,1 ml Phosphatpuffer mehr als bei der Dissoziationsreaktion zugegeben und die Inkubation nach 2,3,5,10,20,30 und 60 min durch Zugabe von 0,1 ml Dextranskohle gestoppt.

2. Untersuchung der Dissoziationsreaktion:

a) Kompetitionsmethode: 30 min nach der Inkubation von Antikörper und markiertem Östrogen wurden 0,1 ml der Lösung des unmarkierten Haptens zugegeben (Nachinkubation). Deren Konzentration betrug $1,48 \mu\text{mol/l}$. In einem gesonderten Versuch wurde die Konzentration variiert und in einem Bereich von $7,4$ bis 1480 nmol/l untersucht. Nach einer Inkubationszeit bis zu 240 Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von Dextranskohle oder Ammoniumsulfat beendet.

α) Dextranskohle: Nach Zugabe von 0,1 ml Dextranskohle wurde bei $0-4^{\circ}\text{C}$ 1 min lang zentrifugiert und vom Überstand 1,0 ml sofort in die Scintillationsgefäße gebracht.

β) Ammoniumsulfat: Nach der Zugabe von 0,42 ml gesättigter Ammoniumsulfatlösung wurde 1 min geschüttelt. Die Lösung wurde 10 min lang in ein Eisbad gestellt und anschließend bei $0-4^{\circ}\text{C}$ 1 min zentrifugiert. 1,0 ml

Überstand wurden sofort in ein Scintillationsgefäß pipettiert.

b) Adsorptionsmethode: Unter sonst gleichen Bedingungen wie bei der Kompetitionsmethode beschrieben, wurden 40-fach größere Mengen in einem Kühltopf inkubiert. Nach Zugabe von 4,0 ml Kohle-Suspension wurden zu definierten Zeiten aus dem ständig gerührten Ansatz 1,2 ml abpipettiert und zentrifugiert. Vom Überstand wurden 1,0 ml zur Bestimmung der Radioaktivität abpipettiert.

3. Ergebnisse

3.1 Reaktionsgleichgewicht

Bei 5°C wird das Gleichgewicht zwischen ^3H -Östradiol, Anti-Östradiol-Antikörper und ^3H -Östradiol-Anti-Östradiol-Antikörper-Komplex $\text{P}^{\text{x}}\text{Q}$ nach 10 min erreicht (Abb. 1).

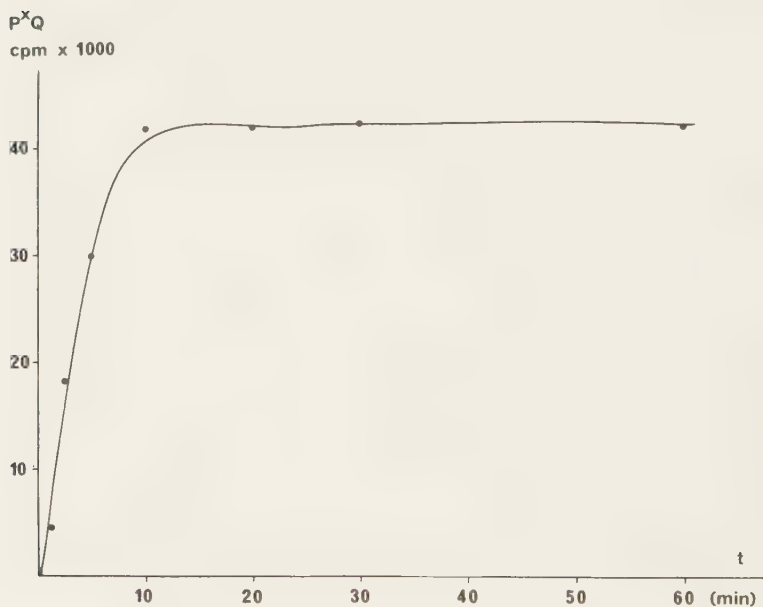


Abb.1 Einstellung des Gleichgewichts der Antikörper-Hapten-Reaktion. Ansatzlösung: T=5°C, ^3H -Östradiol 0,7 nmol/l, Anti-Östradiol-Antiserum E2 q=1,1 nmol/l. Die Reaktion wurde nach verschiedenen Zeiten durch Kohlezugabe unterbrochen.

3.2 Einfluß der Kompetitormenge und der Nachinkubationsdauer

Bei der Inkubation von ^3H -Östradiol-Anti-Östradiol-Antikörper-Komplex $\text{P}^{\text{x}}\text{Q}$ mit unmarkiertem Östradiol (Nachinkubation) erfolgt eine Verdrängung von markiertem Östradiol, deren Ausmaß von der Menge des unmarkierten Östradiols (in einem Versuch Variation von 0,74 - 148 pmol) und der Dauer der Nachinkubation (30 min bis 24 Stunden) abhängt (Abb.2). Mit längerer Dauer der Nachinkubation, d.h. der Dissoziationszeit von $\text{P}^{\text{x}}\text{Q}$, werden für gegebene Mengen an zugesetztem Östradiol die gleichen B_t/B_0 -Werte (B_t : gebundenes markiertes Östradiol, B_0 : gebundenes markiertes Östradiol zum Zeitpunkt Null) erhalten, wie bei gleichzeitiger Zugabe von markiertem und unmarkiertem Hapten, d.h. wie im Reaktionsgleichgewicht. Für gegebene Zeiten ist der Unterschied von B_t/B_0 in der Dissoziationsreaktion zu B_t/B_0 im Reaktionsgleichgewicht am stärksten, wenn mit Mengen größer 7,4 pmol nichtmarkiertem Hapten nachinkubiert wurde. Wie Abb.2 zeigt, verlaufen die Kurven ab dieser Menge parallel zur Ordinate.

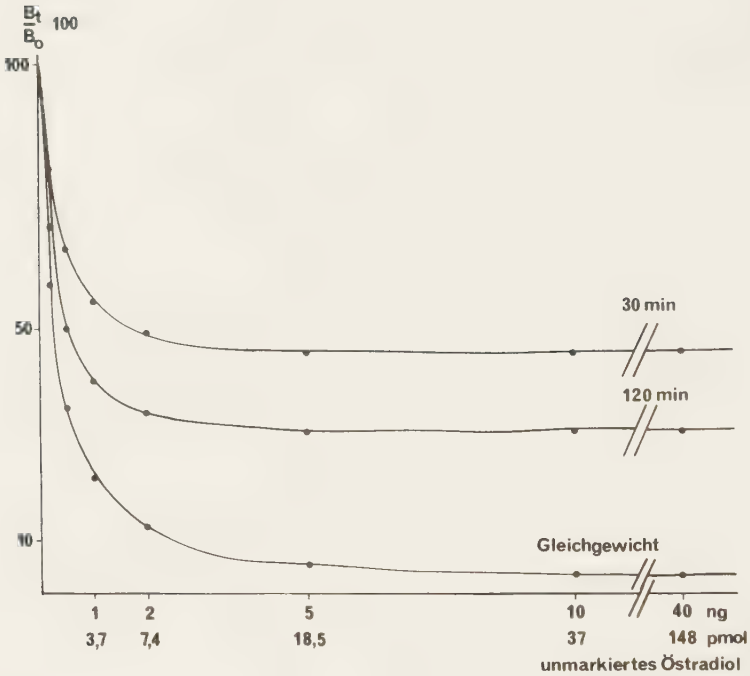


Abb. 2 Bindung von ^3H -Östradiol durch das korrespondierende Antiserum in Abhängigkeit von Zusatz von nicht-markiertem Östradiol. Ansatzlösung: $T=5^\circ\text{C}$, ^3H -Östradiol $0,7 \text{ nmol/l}$, Anti-Östradiol-Antiserum $E2 \text{ } q=1,1 \text{ nmol/l}$. (B_t : am Antikörper gebundenes markiertes Östradiol, B_0 : zur Zeit Null gebundenes markiertes Östradiol).

3.3 Einfluß der Bestimmungsmethoden

Drei Methoden zur Untersuchung der Dissoziationsgeschwindigkeit des Hapten-Antikörper-Komplexes wurden miteinander verglichen: 1) Kompetitionsmethode mit ei-

nem Überschuß unmarkierten Haptens und a) anschließender Kohletrennung oder b) Ammoniumsulfattrennung, 2) Adsorptionsmethode mit Dextranskohle (Beschreibung siehe Methoden). Die Versuche wurden bei allen 3 Methoden bei 5 und 15°C mit den Antiseren D2, E2 und F2 durchgeführt. Abb.3 zeigt für die 3 Methoden die gleiche lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus der Konzentration des Östradiol-Anti-Östradiol-Antikörper-Komplexes und der Dissoziationszeit für den Anfangsteil der Dissoziation. Die Korrelationskoeffizienten lagen zwischen 0,983 und 0,999. Die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten k_{21} der Östradiol-Anti-Östradiol-Antikörper-Komplexe sind in Tab.2 und 3 aufgeführt. Es zeigt sich, daß kein wesentlicher Unterschied zwischen den nach 3 verschiedenen Methoden gewonnenen Ergebnissen besteht.

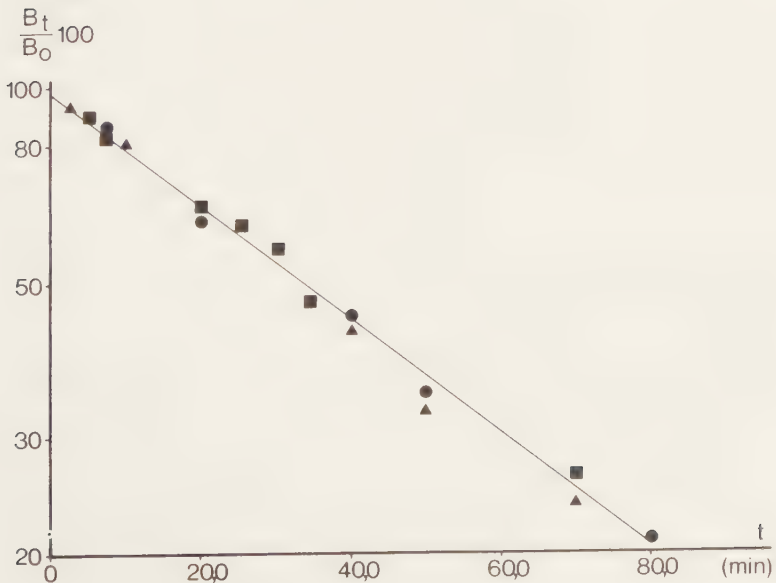


Abb.3 Vergleich verschiedener Methoden zur Bestimmung der Dissoziationsgeschwindigkeit markierter Hapten-Antikörper-Komplexe: Kompetitions-methode mit Kohle- (●—●) bzw. Ammoniumsulfattrennung (■—■) und Adsorptionsmethode (▲—▲). Ansatzlösung: $T=5^{\circ}\text{C}$, ^3H -Östradiol 0,7 nmol/l, Anti-Östradiol-Antiserum F2 $q=5,2$ nmol/l. B_0 : Betrag des markierten Komplexes zur Zeit $t=0$; B_t : Betrag des markierten Komplexes zur Zeit t .

Methode	Antiserum		
	D2	E2	F2
Kompetition und Kohle	3,37	3,63	3,31
Kompetition und Am.-sulf.	3,14	3,86	3,25
Adsorption	3,14	3,46	3,35
$\bar{x}$	3,21	3,65	3,30

Tab.2 Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten k_{21} ($\times 10^4 \text{ sec}^{-1}$) des Östradiol-Anti-Östradiol-Antikörper-Komplexes bei verschiedenen Trenntechniken und Antiseren. Ansatzlösung: $T=5^{\circ}\text{C}$, ^3H -Östradiol 0,7 nmol/l, Antiserum D2, E2, F2 $q=0,65; 1,1; 5,2$ nmol/l.

Methode	Antiserum	
	E2 AS	E2 G
Kompetition und Kohle	6,79	6,56
Kompetition und Am.-sulf.	6,40	6,71
Adsorption	6,25	6,60
$\bar{x}$	6,48	6,64

Tab.3 Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten k_{21} ($\times 10^4 \text{ sec}^{-1}$) des Östradiol-Anti-Östradiol-Antikörper-

Komplexes. Ansatzlösung: $T=15^{\circ}\text{C}$, ^3H -Östradiol $0,7 \text{ nmol/l}$, Anti-Östradiol-Antiserum E2 und Gamma-Globulin-Fraktion des gleichen Serums $q=1,1$ und $0,85 \text{ nmol/l}$.

3.4 Darstellung der Dissoziation von Hapten-Antikörper-Komplexen

3.4.1 Darstellung des Verlaufs der Dissoziation

Das Dissoziationsverhalten des Östrogen-Anti-Östrogen-Komplexes läßt sich mit Hilfe von Geraden beschreiben. Bei Temperaturen von 5 und 15°C (Abb.4) zeigt sich nach einer Dissoziationszeit von ungefähr 60 bis 80 min , daß die Dissoziationsgeschwindigkeit langsamer wird. Der zweite, langsamere Verlauf der Dissoziation des Komplexes umfaßt jedoch nur einen geringen Teil der Gesamtdissoziation (z.B. 10% in Abb.4 bei 15°C).

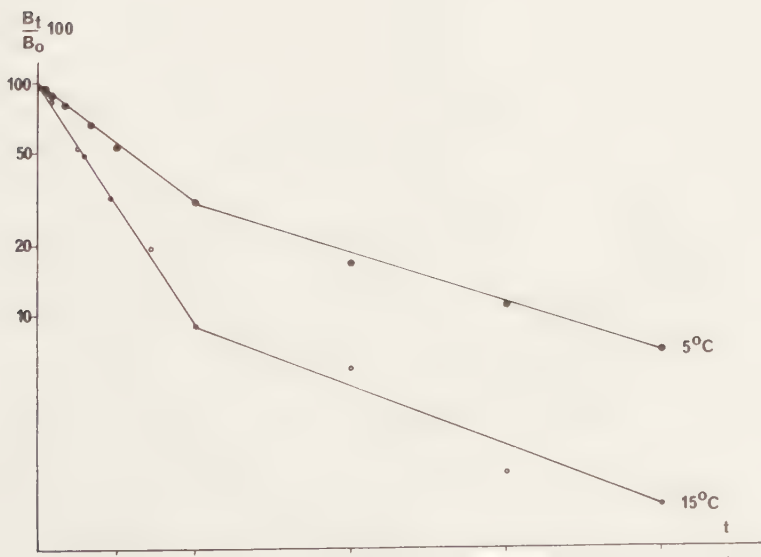


Abb.4 Dissoziation des Östradiol-Anti-Östradiol-Antikörper-Komplexes. Ansatzlösung: T=5 und 15°C, ^3H -Östradiol 0,7 nmol/l, Anti-Östradiol-Antiserum E2 q=1,1 nmol/l.

3.4.2 Einfluß der Haptenkonzentration bei verschiedenen Temperaturen

Alle im folgenden dargestellten Ergebnisse wurden mit Hilfe der Kompetitionsmethode und Kohletrennung gewonnen. Tab.4 zeigt am Beispiel des Östradiol-Anti-Östradiol-Antikörper-Komplexes den Einfluß der Haptenkonzentration und der Temperatur auf die Dissoziationsgeschwindigkeit des Komplexes. Die Konzentration des markierten Haptens in der Ansatzlösung wurde von 0,07 bis 2,22 nmol/l variiert, die Temperatur von 5 bis 35°C. In allen Fällen hatte die Anfangskonzentration des ^3H -Östradiol-Anti-Östradiol-Antikörper-Komplexes keinen merklichen Einfluß auf die Dissoziationsgeschwindigkeit.

Mark. Hapten nmol/l	Temperatur °C			
	5	15	25	35
0,07	3,63	6,75	10,55	12,49
0,74	3,39	6,79	10,13	11,95
2,22	3,66	6,63	10,05	12,53
$\bar{x}$	3,56	6,72	10,24	12,32

Tab.4 Konzentrationsabhängigkeit der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{21} ($\times 10^4 \text{ sec}^{-1}$) des Östradiol-Anti-Östradiol-Antikörper-Komplexes bei verschiedenen

Temperaturen. $T=5,15,25,35^{\circ}\text{C}$, Anti-Östradiol-Antiserum
E2 $q=1,1 \text{ nmol/l}$.

3.4.3 Einfluß von Antiserumbestandteilen: Vergleich von Antiseren mit Gamma-Globulin-Fraktionen

Untersucht wurde die Dissoziationsgeschwindigkeit von
Östron, Östradiol und Östriol aus den Komplexen mit den
korrespondierenden Antikörpern. Es wurden Antiseren und
die davon isolierten Gamma-Globulin-Fraktionen einge-
setzt. Wie Tab.3 und der Anhang (Tab.1,2,3) zeigen, fan-
den sich keine merklichen Unterschiede.

3.4.4 Einfluß der Temperatur

Die Temperaturabhängigkeit der Dissoziationsgeschwindig-
keit von Östron, Östradiol und Östriol wurde im Bereich
von 5 bis 35°C mit Antiseren und Gamma-Globulinen unter-
sucht. Die Temperaturabhängigkeit der Dissoziationsre-
aktion wurde durch die Dissoziationsgeschwindigkeits-
konstanten k_{21} und die Halbwertszeiten des Komplexes
ausgedrückt. Zu deren Ermittlung wurden bei den einzel-
nen Antiseren die bei einer bestimmten Temperatur mit
verschiedenen Hapten-Antikörper-Konzentrationen gewon-
nenen Regressionsgeraden gemittelt und daraus eine mitt-
lere Halbwertszeit berechnet, die in den Tabellen 5,6
und 7 angegeben wird.

T	Antiserum						
	H2		J2		K2		HWZ mittl.
	HWZ	k21	HWZ	k21	HWZ	k21	
5	53	2,18	54	2,14	54	2,14	54,5
15	26	4,44	25	4,62	25	4,62	25,2
25	14	8,25	13	8,88	13	8,88	13,3

Tab.5 Halbwertszeit (HWZ) und Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante (k21) der Ostron-Anti-Östron-Antikörper-Komplexe (T in °C, HWZ in min, k21 x 10⁴ in sec⁻¹).

T	Antiserum						
	D2		E2		F2		HWZ mittl.
	HWZ	k21	HWZ	k21	HWZ	k21	
5	36	3,21	33	3,50	34	3,40	34,5
15	19	6,08	17	6,79	19	6,08	18,3
25	12	9,63	11	10,50	12	9,63	11,7
35	9	12,85	9	12,85	9	12,85	9,0

Tab.6 Halbwertszeit (HWZ) und Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante (k21) der Östradiol-Anti-Östradiol-Antikörper-Komplexe (T in °C, HWZ in min, k21 x 10⁴ in sec⁻¹).

T	Antiserum						
	H2		J2		K2		HWZ mittl.
	HWZ	k21	HWZ	k21	HWZ	k21	
5	50	2,31	50	2,31	49	2,36	49,8
15	25	4,62	25	4,62	23	5,02	24,2
25	11	10,50	11	10,50	11	10,50	11,0

Tab.7 Halbwertszeit (HWZ) und Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante (k_{21}) der Östriol-Anti-Östriol-Antikörper-Komplexe (T in $^{\circ}\text{C}$, HWZ in min, $k_{21} \times 10^4$ in sec^{-1}).

Wie Tab.5,6,7 und Abb.5 zeigen, ist der Effekt der Temperatur auf die Dissoziationsgeschwindigkeit von Östron, Östradiol und Östriol von ihren korrespondierenden Antisera beträchtlich. Eine Temperatursteigerung um 10°C bewirkt dabei ungefähr eine Verkürzung der Halbwertszeit auf die Hälfte.

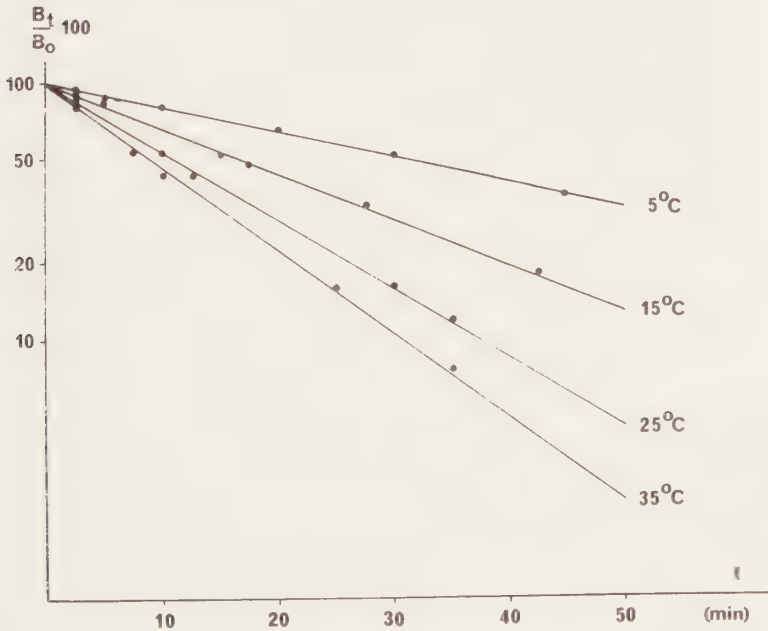


Abb.5 Dissoziation des Östradiol-Anti-Östradiol-Anti-

körper-Komplexes bei verschiedenen Temperaturen. Ansatzlösung: $T=5-35^{\circ}\text{C}$, ^3H -Östradiol $0,7 \text{ nmol/l}$, Anti-Östradiol-Antiserum E2 $q=1,1 \text{ nmol/l}$.

3.4.5 Aktivierungsenergie der Dissoziationsreaktion

Nach Arrhenius ist die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{21} in folgender Weise temperaturabhängig:

$$\ln k_{21} = H \frac{A}{RT}$$

H wird als Häufigkeitsexponent, A wird als Aktivierungsenergie bezeichnet (15,16). A kann durch Auftragung des Logarithmus der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten k_{21} als eine Funktion der reziproken absoluten Temperatur im Arrhenius-Diagramm ermittelt werden. Aus den Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten der Östrogene ergeben sich auf diese Weise folgende Aktivierungsenergien: Östron $12,4 \text{ kcal/mol}$, Östradiol $10,1 \text{ kcal/mol}$ und Östriol $15,1 \text{ kcal/mol}$ (Abb.6)

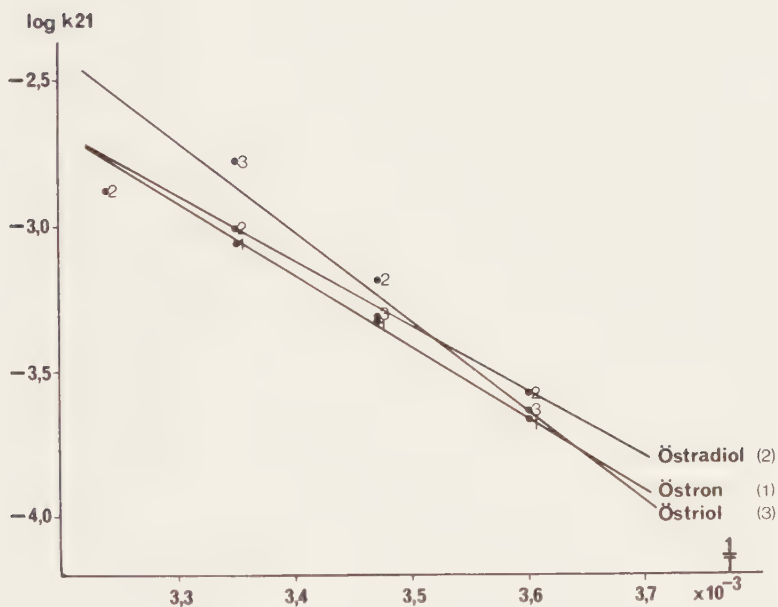


Abb.6 Arrhenius-Diagramm: Temperaturabhängigkeit der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten k_{21} . $\log_{10}$ der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{21} ist als eine Funktion der reziproken absoluten Temperatur ange-tragen.

Antiseren: Anti-Östron-Antiserum H2 $q=6,0$ nmol/l, Anti-Östradiol-Antiserum E2 $q=1,1$ nmol/l, Anti-Östriol-Anti-serum H2 $q=1,25$ nmol/l.

4. Diskussion

4.1 Diskussion der Versuchsmethodik

4.1.1 Assoziation von Hapten und Antikörper

Zur Untersuchung der Dissoziationsgeschwindigkeit des Hapten-Antikörper-Komplexes Östrogen-Anti-Östrogen-C6-Konjugat-Antikörper wurde vom Gleichgewichtszustand der beteiligten Moleküle ausgegangen. Nach kinetischen Gesetzen erfolgt diese Einstellung des Gleichgewichts in einer Reaktion II. Ordnung (17). Die Assoziationsreaktion zwischen Hapten und Antikörper verläuft außerordentlich rasch. Nach 3 Minuten ist der überwiegende Teil der Reaktion bereits abgelaufen (Abb.1). Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten kann angenommen werden, daß die Einstellung des Gleichgewichts abgeschlossen ist. Smith e.a. (18) weisen allerdings darauf hin, daß bei niedrigen Haptenkonzentrationen die volle Gleichgewichtseinstellung innerhalb einer heterogenen Antikörperpopulation längere Zeit benötigen könnte.

4.1.2 Dissoziation des Hapten-Antikörper-Komplexes

Zur Bestimmung der Dissoziationsgeschwindigkeit des Hapten-Antikörper-Komplexes diente die Radioaktivität der ^3H -markierten Haptene als Meßgröße. Aus dem Einsatz radioaktiver Haptene ergeben sich besondere Vor-

teile: 1) Die Möglichkeit, Steroide mit hoher spezifischer Radioaktivität zu verwenden, erlaubt es, geringe Mengen mit hoher Präzision zu messen. 2) Bei den Reaktionen bleibt die Stöchiometrie erhalten. 3) Die zunächst vertretbare Annahme der chemischen und immunologischen Identität von ^3H -markierten und nichtmarkierten Haptenen erlaubt die Anwendung einer "Kompetitionsmethode" zur Verhinderung einer Reassoziaton des Hapten-Antikörper-Komplexes.

Zum Ausschluß systematischer Fehler wurde die Dissoziationsgeschwindigkeit nach zwei Methoden, der "Kompetitionsmethode" und der "Adsorptionsmethode" bestimmt. Da die Radioaktivität auf gebundene und freie Haptene verteilt ist, mußte vor der Bestimmung des gebundenen (B) oder freien (F) Anteils der gesamten Radioaktivität (T) eine B/F-Trennung erfolgen. Diese ist ohne Störung des Gleichgewichts (I) (z.B. durch Gleichgewichtsdialyse oder Ultrazentrifugation) wünschenswert, aber für kinetische Untersuchungen nicht durchführbar. Deswegen mußten Fehler der Verfahren mit Störung des Gleichgewichts (Adsorption des freien Haptens, Fällung des Hapten-Antikörper-Komplexes) in Kauf genommen werden. Probleme dieser Art entfallen bei der "temperature jump-" (11) und "stopped flow-" (19) Fluorimetrie, die allerdings einen größeren apparativen Aufwand benötigen. Um Fehler der B/F-Trennung erkennen zu können, wurden die Ergebnisse nach Trennung mit Dextransulfat und mit Ammoniumsulfat verglichen.

4.1.3 Verhinderung der Reassoziatio

Zur Verhinderung der Reassoziatio des Haptens mit dem Antikörper wurden zwei Verfahren miteinander verglichen, die Kompetitions- und die Adsorptionsmethode.

1) Kompetiti

Die bereits von Berson und Yalow (20) beschriebene Kinetik der Dissoziatio in Gegenwart eines kompetitiven Inhibitors setzt dessen unendlich große Konzentration voraus. Die in Abb.2 dargestellten Ergebnisse der Untersuchung über den Einfluß der Inhibitor

Konzentration auf die Dissoziatio zeigen folgendes: Der parallel zur x-Achse verlaufende Teil der Kurven charakterisiert den Bereich, in dem das nicht markierte Steroid in einer so großen Konzentration vorliegt, daß eine Reassoziatio des markierten Steroids praktisch nicht mehr erfolgt. In diesem Bereich beruht die Abnahme der am Antikörper gebundenen Radioaktivität nur noch auf der Dissoziatio des Hapten-Antikörper-Komplexes, d.h. bei Nachinkubation mit z.B. 0,148 $\mu\text{mol/l}$ unmarkierten Haptens kann aus der Konzentration des gebundenen markierten Haptens zu verschiedenen Zeiten die Dissoziationsgeschwindigkeit angegeben werden.

2) Adsorptionsmethode

Bei der von Milgrom und Baulieu (21) als "differential dissociation technique" eingeführten Methode wird das freie Hapten mit einer "unendlichen" Menge eines Adsorbenten, z.B. Kohle entfernt. Nachdem die Kohle das

freie Hapten aufgenommen hat, kann die Konzentration des Komplexes ohne Schwierigkeiten gemessen werden, wenn der Ligand radioaktiv markiert ist. Nach Gleichung (I) dissoziiert mit fortschreitender Zeit markiertes Hapten vom Komplex, das sofort von der Kohle adsorbiert wird, wodurch sich eine ständige Verminderung der Konzentration des meßbaren, markierten Komplexes ergibt.

4.1.4 Trennung von gebundenem und freiem Hapten

Die Technik der Trennung des freien vom gebundenen Hapten sollte folgenden Forderungen genügen (22):

1) Komplette Trennung des gebundenen und freien Haptens ohne Beeinflussung der Primärreaktion, 2) Einfachheit, Schnelligkeit, 3) keine Beeinflußbarkeit durch Serum oder Plasma. Üblich sind folgende Verfahren: Ausnutzung der unterschiedlichen Wanderung von gebundenen und freien Fraktionen (z.B. Papierchromatoelektrophorese), Adsorptionsmethoden (z.B. Kohle, Silikate), fraktionierte Fällung, Doppelantikörpermethode, Solid-phase-Methoden (22,23). Von uns wurden zur Trennung von freiem und gebundenem Hapten zwei Verfahren angewandt:

1) Kohletrennung: Kohle ist bereits in breitem Maße zur Trennung des freien und des an den Antikörper gebundenen Liganden eingeführt (24,25). Man nimmt an, daß die Adsorption an Dextranskohle nach dem Massenwirkungsgesetz geschieht. Dabei sind bei Anwendung der Kohletechnik

folgende Fehler zu erwarten: 1) keine vollständige Adsorption von freiem Hapten, 2) Adsorption von Hapten-Antikörper-Komplex, 3) weitere Dissoziation des Haptens vom Antikörper während der Trennung mit Kohle (24, 26, 27). Einleuchtend ist, daß sich alle drei Arten von Fehlern unter den gegebenen Bedingungen nicht ganz ausschließen lassen. Bei der von uns verwendeten Konzentration der Kohle wurde das freie Hapten praktisch vollständig adsorbiert (Dissertation K. Gloning, München 1978). Fehler 2 und 3 konnten durch eine möglichst kurze Trennzeit klein gehalten werden. Bei unseren Experimenten hielten wir eine Reaktionszeit mit der Kohle von einer Minute ein, die zwar ausreicht, das freie Hapten zu binden, bei der aber die Adsorption und die Dissoziation des Komplexes vernachlässigbar sind.

2) Trennung mit Ammoniumsulfat: Ammoniumsulfat fällt den Komplex und nicht das freie Hapten. Das Prinzip der fraktionierten Fällung mit Salzen beruht auf der selektiven Fällung von Immunglobulinen bei einer bestimmten Konzentration des Präzipitanden, wodurch die freie Fraktion in Lösung bleibt. Dieser Vorgang beruht größtenteils auf elektrostatischen Kräften und ist durch eine Reihe von Faktoren beeinflussbar, wie z.B. Temperatur, pH, Proteinkonzentration. Trennungsfehler können durch die Fällung freien Haptens, die unvollständige Fällung des Komplexes und die Dissoziation des Liganden vom Komplex (28) entstehen. Von Bedeutung dürfte nur der

zweite Fehler sein, da eine Fällung von Steroiden in den verwendeten Konzentrationen nicht stattfindet. Die unvollständige Fällung des Komplexes läßt sich jedoch durch Optimierung der Konzentration des Ammoniumsulfats weitgehend unterdrücken (13). Auch ist zu berücksichtigen, daß in der vorliegenden Untersuchung Relativmessungen angestellt wurden. Ein systematischer Fehler der Trennung wird keinen Einfluß auf die Zeitkurven nehmen. Wie Tab.1 und 2 zeigen, betragen die Abweichungen der Messungen unter den verschiedenen Techniken nur wenige Prozent. Damit kann angenommen werden, daß in keiner Messung ein systematischer Fehler vorliegt (29).

4.2 Diskussion der Meßwerte

4.2.1 Verlauf der Dissoziation

Das Dissoziationsverhalten der Haptene von ihren spezifischen Antikörpern wurde über Zeiten bis zu 240 min verfolgt. Dabei läßt sich bei fortgeschrittenen Zeiten ein langsamerer Verlauf erkennen. Dieser ist jedoch nur bei 5 und 15°C zu beobachten und umfaßt nur wenige Prozent der Hapten-Antikörper-Komplex-Menge (Abb.4). Folgende Deutung bietet sich an:

Verschiedene Autoren, die über ähnliche Erscheinungen berichten (18,30,31), führen diese auf die Heterogenität des verwendeten Antikörpers zurück. Zum Beispiel

finden Smith e.a. (18,30) derartige Dissoziationskurven bei Digitoxin-Anti-Digitoxin- und Strophantin-Anti-Strophantin-Antikörper-Komplexen. Für diese Darstellung spricht die Tatsache, daß Antikörper ein Gemisch verschieden stark bindender Einzelmoleküle darstellen. Immerhin zeigt sich bei Werblin e.a. (32), daß nach einer Immunisierungszeit von mehreren Wochen das Antiserum praktisch aus zwei verschiedenen stark bindenden Fraktionen besteht, wobei jede einzelne aber relativ homogen ist.

Ein Vergleich mit dem Dissoziationsverhalten des Insulin von Insulin-Rezeptor-Komplexen zeigt, daß dort ähnliche biphasische Verläufe von Dissoziationsgeschwindigkeiten gemessen wurden (33).

Gegen die Notwendigkeit, nur der Heterogenität der Antikörper entscheidendes Gewicht beizumessen, sprechen zwei Gründe:

a) Bei Erhöhung der Konzentration des zugeführten markierten Haptens um das 30-fache (von 0,07 auf 2,22 nmol/l) zeigt sich keine Veränderung im Kurvenverlauf. Bei ausgeprägter Heterogenität müßte man bei der geringeren Haptenkonzentration erwarten, daß nur die am besten bindenden Antikörper einen Komplex bilden, der dann entsprechend langsamer dissoziiert und somit den Anteil des langsameren Verlaufs der Dissoziationskurve erhöht (Tab.4).

b) Bei Annahme von Heterogenität müßte bei einer Änderung der Temperatur der extrapolierte Anteil des lang-

sam bindenden Teils unverändert bleiben. Dies ist zu fordern aus der Überlegung, daß das Mengenvorhältnis der verschiedenen Antikörperpopulationen bei jeder Temperatur gleich ist. Bei höheren Temperaturen ließ sich von uns der 2. Teil im Kurvenverlauf nicht mehr erfassen. Dies spricht gegen die Heterogenität des Antikörpers, vorausgesetzt, daß die höheren Temperaturen die Meßgenauigkeit nicht beeinflußt haben.

Eine unspezifische Bindung ist als eine weitere Erklärung in Betracht zu ziehen. Wie Rodbard (34) abhandelt, wird durch Überlagerung mit einer unspezifischen Bindung die Dissoziationsgeschwindigkeit eines spezifisch bindenden Proteins als eine stark gekrümmte Kurve dargestellt, aus der man zwei Anteile, einen spezifischen und einen unspezifischen gewinnen kann.

Zusammenfassend läßt sich aufgrund der gesicherten Heterogenität der Antikörper (32) annehmen, daß diese hauptsächlich für die Verlangsamung der Dissoziationsgeschwindigkeit bei 5 und 15°C nach 60 bis 80 Minuten verantwortlich sein wird. Eine unspezifische Bindung kann ebenfalls eine gewisse Rolle spielen. Wie weit noch andere Einflüsse für den Effekt verantwortlich sind, läßt sich nicht mit Sicherheit entscheiden.

4.2.2 Einfluß der Hapten-Konzentration

Der Vergleich des Dissoziationsverhaltens bei verschiedenen Hapten-Antikörper-Komplex-Konzentrationen zeigte

keinen Unterschied (Tab.4), was als Hinweis dafür angesehen werden kann, daß die Dissoziationsreaktion nach dem Reaktionsschema I.Ordnung abläuft bei der Konzentrationsunabhängigkeit vorherrscht. Die Konzentration des Antikörpers wurde bei unseren Versuchen konstant gehalten. Goldenberg e.a. (35) hatten bei der Gastrin-Anti-Gastrin-Wechselwirkung eine Abhängigkeit der Affinitätskonstante K_{ass} von der Antikörperverdünnung aufgezeigt.

4.2.3 Einfluß des Antigens und des antikörperproduzierenden Tieres

Von den Anti-Östron-, Anti-Östradiol- und Anti-Östriol-Antisera wurden jeweils die Antikörper dreier Tiere getestet. Es zeigten sich nur geringe individuelle Unterschiede (Tab.5-7). Auch der Unterschied der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten k_{21} der Komplexe von Östron, Östradiol und Östriol mit ihren korrespondierenden Antikörpern ist gering (siehe Anhang Tab.1-3).

II

DISSOZIATIONSGESCHWINDIGKEITEN DER KOMPLEXE VON
ANTI-ÖSTROGEN-C6-KONJUGAT-ANTIKÖRPERN MIT UNMAR-
KIERTEN ÖSTROGEN-C6-DERIVATEN

1. Grundlagen

Die Dissoziation der Komplexe von Antikörpern mit unmarkierten Haptenen gehorcht den Gesetzen der Reaktionskinetik, die bereits im I. Teil dieser Arbeit (I. 1. Grundlagen) skizziert wurden. Unter Anwendung der dort ebenfalls beschriebenen "Adsorptionsmethode" beginnt nach Zugabe des Adsorptionsmittels zur Zeit t_0 die Dissoziationsreaktion



Das freie Hapten P wird durch Adsorption ständig aus der Reaktion entfernt. Beim Vorliegen unmarkierter Reaktionspartner liegt das besondere Problem darin, daß ihre Konzentrationen nicht leicht zu messen sind. Dieses Problem kann mit Hilfe einer "Sequentialinkubation" gelöst werden. Zu den Zeiten t_1 bis t_n werden Proben aus der 1., der "Adsorptionsinkubation", entnommen, die konstante Mengen $q = (PQ) + (Q)$ und mit der Zeit t zunehmende Mengen Q und abnehmende Mengen PQ enthalten. Diese Proben werden in der 2. Inkubation für definierte Zeit mit einer definierten Menge eines markierten Haptens p^x versetzt. Die Menge P^xQ , die sich während der 2. Inkubation bildet, ist abhängig von der Menge PQ bzw. Q, die aus der 1. Inkubation übernommen wurden und dient als deren Meßgröße und kennzeichnet damit das Fortschreiten der Dissoziation von PQ. P^xQ ist einfach zu bestimmen, da P^x nach bekannten Verfahren von P^xQ

abgetrennt werden kann. Für die Präzision der Sequentialmethode ist die Dauer der 2. Inkubation kritisch, da der Gleichgewichtszustand zwischen P , P^x , Q , PQ und P^xQ nicht abgewartet wird.

2. Material und Methoden

Unmarkierte Haptene

- 1) 1,3,5(10)-östratrien-3,17 β -diol (Östradiol-17 β) (E2)
- 2) 1,3,5(10)-östratrien-3,6 α ,17 β -triol (6 α -Hydroxy-Östradiol-17 β) (E2-6 α -OH)
- 3) 1,3,5(10)-östratrien-3,6 β ,17 β -triol (6 β -Hydroxy-Östradiol-17 β) (E2-6 β -OH)
- 4) 3,17 β -dihydroxy-1,3,5(10)-östratrien-6-on (6-Oxo-Östradiol-17 β) (E2-6-oxo)
- 5) 3,17 β -dihydroxy-1,3,5(10)-östratrien-6-on-oxim-O-methyläther (Östradiol-17 β -6-oxim-O-Methyläther) (E2-6-O-Me)
- 6) 3,17 β -dihydroxy-1,3,5(10)-östratrien-6-on-oxim-O-carboxy-methyläther (Östradiol-17 β -6-carboxy-methoxim) (E2-6-cmo)
- 7) N $^{\epsilon}$ -[(3,17 β -dihydroxy-1,3,5(10)-östratrien-6-yliden-aminoxy)acetyl]-N $^{\alpha}$ -hippuryl-lysin (Östradiol-6-carboxymethoxim-Hippuryllysin) (E2-6-cmo-lys)
- 8) N-[(3,17 β -dihydroxy-1,3,5(10)-östratrien-6-yliden-aminoxy)acetyl]-histamin (Östradiol-6-carboxy-methoxim-Histamin) (E2-6-cmo-his)

1) wurde von E.Merck, Darmstadt, BRD bezogen, 2) und 4) wurden bei der Fa. Ikapharm, Ramat-Gan, Israel gekauft.

3,5-8) wurden vom Labor zur Verfügung gestellt (Präparation Dr.W.Dirr). Stammlösungen wurden durch Einwägen der Substanzen (zwischen 0,3 und 0,8 mg) auf einer Elektrobalance-Waage der Fa. Ventron Instruments Cooperation, Paramount, California, USA und Lösen in spektralreinem Äthanol (Uvasol) bereitet. Aus ihnen wurden Arbeitslösungen gewonnen, indem definierte Volumina mit Stickstoff eingedampft und der Rückstand über Nacht mit Phosphatpuffer (pH 7,2) gelöst wurde. Die Konzentration der Lösung betrug 3,70 nmol/l. Sie wurden bei 0-4°C aufbewahrt.

Markierte Haptene

$[2,4,6,7-^3\text{H}_4]$ -Östradiol-17B (90Ci/mmol) wurde von NEN, Boston, Mass., USA bezogen und bei -18°C in Methanol/Benzol gelagert. Die Reinheit wurde durch Papierchromatographie überprüft. Arbeitslösungen wurden durch Eindampfen eines bestimmten Volumens der Stammlösung mit Stickstoff und Lösen des Rückstandes in Phosphatpuffer bereitet. Die eingestellte Konzentration betrug 11,10 nmol/l.

Antiseren

Als Antiseren wurden die vom Labor zur Verfügung gestellten Anti-Östradiol-17B-Antiseren (4) verwendet. Antiseren von drei immunisierten Kaninchen wurden verglichen. Sie wurden mit Phosphatpufferlösung (pH 7,2) zu Arbeitslösungen verdünnt. Die Antikörperkonzentration dieser Lösungen wurde so eingestellt, daß 0,1 ml davon in einem Ansatzvolumen von 1,2 ml 50% von 0,76 pmol markiertem Steroid band. Tab. 1 zeigt eine Charakteristik der Antiseren.

Anti-E2 Konzentration der Bindungsstellen in
Antiserum der Ansatzlösung in nmol/l bei 15°C

	q
D2 441	0,65
E2 443	1,1
F2 451	5,2

Tab.1 Charakteristik der Antiseren. Die immunisierten Kaninchen sind mit Großbuchstaben bezeichnet, der Index bezieht sich auf die Blutabnahme, die Zahl auf die Nummerierung im Tierstall.

Andere Reagentien

Dextran T 70 von Pharmacia, Uppsala, Schweden; Norit A (4-5µm) von Serva, Heidelberg, BRD; Rinderserumalbumin (RSA) von der Behringwerke AG, Marburg, BRD; Bio-Solv (BBS 3) von Beckman Instruments GmbH, München, BRD; 2,5-Diphenyloxazol (PPO) und 1,4-bis-2-(4-methyl-5-phenyloxyazoly)benzol (POPOP) von W.Zinsser, Frankfurt, BRD; Phosphatpufferlösungen 1/15 mol/l mit 5 mmol/l NaN₃ pH 7,2. Wässrige Lösungen wurden mit "aqua pro injectione" B.Braun, Melsungen, BRD bereitet.

Dextrankohle

0,5 g Norit A, 0,05 g Dextran und 100 ml Phosphatpuffer (pH 7,2) wurden vor Gebrauch mindestens 4 Tage gerührt und bei 4°C dauernd weitergerührt.

Scintillationszählung

100 g PPO und 1,25 g POPOP wurden in 11 Toluol gelöst.

42 ml dieser Lösung und 117 ml Bio-Solv (BBS 3) wurden zu 1 l Toluol gegeben. Die Scintillationszählung wurde mit 15 ml dieser Mischung in einem Packard Modell 2425 durchgeführt. Gezählt wurde 4-10 min. Die Standardabweichung betrug 0,5% oder weniger. Die Zählausbeute von ^3H betrug 32%.

Sequentialinkubationen

In ein temperiertes Glasgefäß werden pipettiert: Die 40-fache Menge von 378 μl Pufferlösung, 400 μl (1,5 pmol) unmarkierte Haptenlösung (oder, zur Bestimmung des Grenzwertes $(P^xQ)_\infty$ 400 μl Pufferlösung an Stelle der Lösung des unmarkierten Haptens), 122 μl Antiserum (Arbeitslösung) und 100 μl Albuminlösung.

Der Ansatz wird 1 Stunde bei 5 oder 25°C gehalten. Anschließend, zum Zeitpunkt $t = 0$, werden je Probe 100 μl Dextran-Kohle-Suspension zugegeben. Unter fortgesetztem Rühren werden zu den Zeitpunkten $t = n_1$ bis $t = n_t$ Minuten 1,1 ml entnommen. Diese Proben werden 1 Minute zentrifugiert, vom Überstand werden 0,9 ml in ein Reaktionsgefäß übergeführt und mit 200 μl (2,2 pmol) ^3H -Östradiol-17 β -Lösung versetzt. Nach 10,0 Minuten wird diese 2. Inkubation durch Zugabe von 100 μl Dextran-Kohle-Suspension beendet. Die Ansätze werden 1 Minute geschüttelt, anschließend bei 0-4°C 1 Minute zentrifugiert. Vom Überstand werden sofort 1,0 ml in ein Zählgläschen übergeführt.

3. Ergebnisse

Die Meßwerte zur Ermittlung der Dissoziationsgeschwindigkeit der Hapten-Antikörper-Komplexe von Anti-E2-AS D2 mit unmarkiertem Östradiol-17 β -6-oxim-O-Methyläther sind in Tab.2 und in Abb.1 dargestellt. Die Gesamtheit der Werte, die nach Inkubationen der Anti-E2-Antiseren D2, E2 und F2 mit den unmarkierten Östradiol-C6-Derivaten erhalten wurden, ist im Anhang Tab.6 zusammengefaßt. Aus den Meßdaten wurde, wie in Tab.2 beschrieben, der Abfall der Konzentration der unmarkierten Hapten-Antikörper-Komplexe berechnet. Die Bestimmung ihrer Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten k_{21} erfolgte nach Gleichung III (Teil I, 1. Grundlagen) in EDV durch lineare Regression nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate (Abb.1). In Tab.3 sind die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten zusammengefaßt. Von Komplexen der Haptene mit Antikörpern des Antiserums Anti-E2-AS E2 wurden die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten bei 2 Temperaturen gemessen. Aus den Ergebnissen wurde nach Arrhenius die Aktivierungsenergie berechnet.

Dissoziationszeit t	$(P^xQ)_t$	$(PQ)_t$
min	cpm	% der Konzentration zur Zeit t = 0
0	45000	100
5	45500	99
25	48200	92
40	49200	89
45	49650	88
50	51500	83
90	56200	73
120	58900	65
150	60900	60
170	62700	56
∞	85000	0

Tab.2 Abfall der Konzentration der unmarkierten Komplexe PQ von Anti-E2-AS D2 mit Östradiol-17 β -6-oxim-O-Methyläther.

Diss.-Zeit t: Dauer der Inkubation von P,Q und PQ
mit Kohle

$(P^xQ)_t$: antikörpergebundene Radioaktivität,
nachdem Q und PQ nach der Inkubation
mit Kohle für 10 Minuten mit P^x inkubiert worden sind

$(PQ)_t$: Konzentration des Komplexes zur Zeit
t in Prozent der Konzentration, die
zur Zeit t = 0 vorlag.

Die Werte für P^xQ zur Zeit $t = 0$ werden mit $(P^xQ)_0$ bezeichnet.

Die Werte für P^xQ zu den Zeiten $t = n$ Minuten werden mit $(P^xQ)_n$ bezeichnet.

Die Werte für P^xQ zur Zeit $t = \infty$ werden mit $(P^xQ)_\infty$ bezeichnet: diese Werte wurden dadurch gewonnen, daß die Primärinkubationen ohne Zusatz von unmarkiertem Hapten durchgeführt worden waren.

Der Abfall der Konzentration des unmarkierten Komplexes PQ nach Kohlezugabe wird wie folgt berechnet:

$$(P^xQ)_\infty - (P^xQ)_0 = \Delta P^xQ_0$$

$$(P^xQ)_\infty - (P^xQ)_n = \Delta P^xQ_n$$

$$(n = 0 \text{ bis } \infty \text{ min})$$

PQ in Prozent der Konzentration zur Zeit $t = 0$:

$$\frac{\Delta P^xQ_n}{\Delta P^xQ_0} \times 100 = PQ_n$$

In der folgenden Abbildung 1 und Tabelle 3 sind der Verlauf der Dissoziation und die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten k_{21} für die von uns verwendeten unmarkierten Östradiol-C6-Derivate dargestellt.

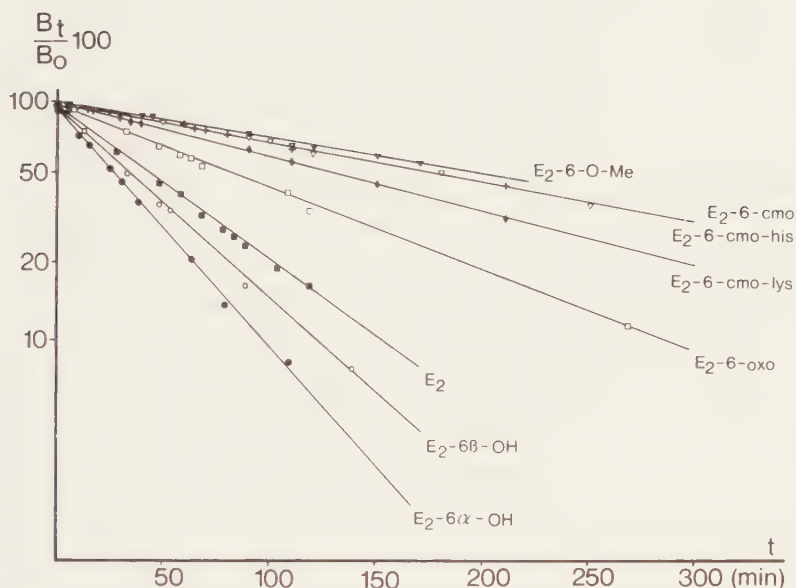


Abb.1 Bindung der unmarkierten Östradiol-C6-Derivate durch Anti-Östradiol-C6-Konjugat-Antiserum. Darstellung der Dissoziationsgeschwindigkeit. Ansatzlösung: Anti-E2-AS D2 (0,65 nmol/l), unmarkierte Liganden (1,5 nmol/l), 3H -Östradiol-17B (2 nmol/l), $T=5^\circ C$. Zur Berechnung der Dissoziationsgeschwindigkeit der unmarkierten Haptene siehe Tab.2.

T = 5°C	k ₂₁ x 10 ⁴ (sec ⁻¹)			t _{1/2} (min)
	Anti-E2-	Anti-E2-	Anti-E2-	
	AS D2	AS E2	AS F2	
E2-6β-OH	4,04	4,15	3,91	28
E2-6α-OH	3,21	3,34	3,32	35
E2	2,59	2,64	2,64	45
E2-6-oxo	1,36	1,18	1,43	80
E2-6-O-Me	0,58	0,61	0,59	200
E2-6-cmo	0,64	0,68	0,64	180
E2-6-cmo-his	0,64	0,64	0,66	180
E2-6-cmo-lys	0,93	0,92	0,90	130

T = 25°C	Anti-E2-AS E2	
E2-6β-OH	11,55	10
E2-6-oxo	7,70	15
E2-6-O-Me	2,88	40
E2-6-cmo	1,92	60
E2-6-cmo-his	1,65	70
E2-6-cmo-lys	2,10	55

Tab,3 Bindung unmarkierter Östradiol-C6-Derivate durch Anti-Östradiol-C6-Konjugat-Antisera. Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten k₂₁ und mittlere Halbwertszeiten. Bei 5°C wurden 3 Antikörper, bei 25°C wurde 1 Antikörper untersucht.

4. Diskussion

4.1 Diskussion der Methode

Die Dissoziationsgeschwindigkeiten unmarkierter Östradiol-Derivate wurden über Folgeinkubationen mit markiertem Östradiol bestimmt. In der 1. Inkubation mit 1,5 nmol/l unmarkiertem Hapten und $q = 0,85$ (1,4; 7,0) nmol/l Antikörper D2 (E2,F2) stellte sich innerhalb der ersten Minuten das Gleichgewicht zwischen P, Q und PQ ein (Dissertation K.Gloning, München 1978). In der 2. Phase der Inkubation wurde dem Ansatz Kohle zugesetzt und das Reaktionsgleichgewicht dadurch gestört, daß freies und frei werdendes P irreversibel von der im Überschuß vorliegenden Kohle adsorbiert wurde. Die Vollständigkeit der Adsorption der unmarkierten Östradiol-C6-Derivate wurde durch Versuche belegt (K.Gloning). Vom nicht adsorbierten $Q + PQ$ ($= q$) wurden zu verschiedenen Zeiten nach Kohlezugabe 0,77 (1,3; 6,2) pmol (Antiserum D2,E2,F2) entnommen und in der 2. Inkubation für 10,0 Minuten mit 2,2 pmol markiertem Hapten P^x umgesetzt. In der Zeit der 2. Inkubation reagiert das markierte Hapten mit dem freien Antikörper und mit dem durch Dissoziation des Komplexes PQ in Gegenwart der Kohle freigewordenen Antikörper. Je schneller der Komplex PQ dissoziiert, desto mehr Q ist entstanden, das mit P^x reagiert, was zu einer Erhöhung der Konzentration von P^xQ

führt. Mit der Messung von P^xQ braucht die absolute Menge von PQ nicht erfaßt zu werden, da bei der Ermittlung der Dissoziationsgeschwindigkeit des Komplexes nur Relativmessungen der Abnahme von PQ erforderlich sind. Als optimale Dauer der Inkubation mit dem Indikatorhapt en P^x erwies sich der Zeitraum von 10 Minuten. In diesem Zeitraum ist die rasche Assoziationsreaktion $P^x + Q \rightarrow P^xQ$ abgelaufen. Das Ausmaß der Störung durch die langsamere Reaktion $PQ \rightarrow P + Q$ ist jedoch noch sehr gering. Die Dauer der Inkubation mit dem Indikatorhapt en mußte sehr präzise eingehalten werden, weil nur dann die in diesem Zeitraum ablaufende zusätzliche Dissoziation von PQ für jede der zu verschiedenen Zeiten zugegebenen Menge P^xQ als konstant angesehen und in der Berechnung der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante vernachlässigt werden konnte. Die geringe Streuung der Meßpunkte um die Regressionsgerade zeigt an, daß diese Bedingungen erfüllt wurden (Abb.1).

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 Einfluß der Hapt en-Strukturen

Die Strukturen der Hapt ene, deren Dissoziationsgeschwindigkeiten aus Antikörper-Komplexen gemessen wurden, unterscheiden sich in folgenden Merkmalen in steigendem Ausmaß von der Struktur der Immundeterminanten des Immu-

nogens, die in der Einleitung in Abb.1 dargestellt ist.

1. E2-6-cmo-lys: Im Immunogen liegen die Carboxy- und die α -Aminogruppen des Lysins als Säureamid-Bindungen in der Albumin-Polypeptidkette fest; im Hapten liegt die Carboxylgruppe frei vor, die α -Aminogruppe ist säureamidartig mit dem Hippurylrest verbunden.

2. E2-6-cmo-his: Im Immunogen ist die Carboxylgruppe des cmo amidartig an ξ -Aminogruppen von Lysinen des Albumins gebunden; im Hapten an die Aminogruppe vom Histidin.

3. E2-6-cmo: Im Immunogen ist die Carboxylgruppe des cmo amidartig an die ξ -Aminogruppe von Lysinen des Albumins gebunden; im Hapten liegt sie frei vor.

4. E2-6-O-Me: Im Immunogen ist die $-\text{CH}_2-$ Gruppe des cmo mit dem Carboxyl des cmo verbunden; im Hapten ist sie zu $-\text{CH}_3$ substituiert.

5. E2-6-oxo: Im Immunogen $=\text{C}=\text{N}-$; im Hapten $=\text{C}=\text{O}$.

6. E2: Im Immunogen coplanares sp^2 hybridisiertes $=\text{C}=\text{N}-$; im Hapten sp^3 hybridisiertes $=\text{CH}_2$.

7. E2-6 α -OH: Im Immunogen coplanares sp^2 hybridisiertes $=\text{C}=\text{N}-$; im Hapten $-\text{HC}-\text{OH}$ mit äquatorialem $-\text{OH}$.

8. E2-6 β -OH: Im Immunogen coplanares sp^2 hybridisiertes $=\text{C}=\text{N}-$; im Hapten $-\text{HC}-\text{OH}$ mit axialem $-\text{OH}$.

Unter der Annahme der Komplementarität zwischen den Strukturen der immundeterminanten Gruppe und der bindenden Region des korrespondierenden Antikörper-Moleküls und unter der Annahme, daß die Affinität zwischen Anti-

gen und Antikörper von der Passung und von der Ausdehnung der komplementären Strukturen abhängt, ist eine Rangliste der Affinitäten von Haptenen entsprechend der Reihenfolge der Aufzählung zu erwarten.

Nach Wettbewerbsversuchen im Gleichgewicht (E.Kuss und W.Dirr, unveröffentlicht) zeigte von den aufgeführten Haptenen das E2-6-oxo die stärkste Konkurrenz zur ^3H -Östradiol-Bindung des Antikörpers. Der daraus zu folgernde Schluß, daß die bindende Region des Antikörper-Moleküls gerade noch die Koplanarität an C6, nicht aber die Unterschiede zwischen =O- und =N-Bindung erkennen kann, war jedoch dadurch in Frage gestellt, daß die Inhibitionskurven der Substanzen 1-4 nicht parallel zu den Inhibitionskurven der Substanzen 5-8 verliefen, sondern diese kreuzten. Weitere Informationen über die Ausdehnung der bindenden Region wurden von den Bestimmungen der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten erwartet. Nach den vorliegenden Ergebnissen erlauben diese Bestimmungen folgende Aussagen.

Die Linearität der Dissoziationskurven im $\ln(PQ)$ -vs.-t-Diagramm (Abb.1) weist darauf hin, daß die Dissoziation des Hapten-Antikörper-Komplexes als monophasischer Prozess behandelt werden kann. Unter den Versuchsbedingungen und innerhalb der Meßgenauigkeit erwiesen sich also die untersuchten Antikörperpopulationen als homogen; deswegen konnte die Stabilität der Komplexe durch die Disso-

ziationsgeschwindigkeitskonstanten bzw. durch die Halbwertszeiten charakterisiert werden. Es ist anzunehmen, daß die Halbwertszeiten umso länger sind, je besser die Bindungsstellen des Antikörpers mit dem Hapten zusammenpassen und je größer die Kontaktregionen von Antikörper und Hapten sind.

Für jedes der untersuchten Haptene wurden übereinstimmende Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten mit Antiseren von drei verschiedenen Tieren erhalten (Tab.3). Hieraus kann gefolgert werden, daß die Rangordnung der Komplexstabilität von den Strukturen von Hapten und Immundeterminanten des Immunogens bestimmt werden und nicht von der zufälligen Eigenart des immunisierten Individuums. Dieses Ergebnis bedeutet, daß der nachgewiesenen Regelmäßigkeit der Komplexstabilität eine allgemeinere Bedeutung zukommt.

Von den untersuchten Haptenen zeigten E2-6 α -OH und E2-6 β -OH die kürzeste Halbwertszeit, die noch unter der des E2 liegt. Dies kann durch die schlechtere Passung des OH-Moleküls an C6 erklärt werden. Dabei ist bemerkenswert, daß E2-6 α -OH, bei dem die OH-Gruppe äquatorial liegt, eine größere Stabilität aufweist als E2-6 β -OH mit einer axialen OH-Gruppe.

Aus der Halbwertszeit des unmarkierten E2 (45 Minuten) und des markierten E2 (34,5 Minuten) läßt sich schließen, daß der Antikörper so spezifisch ist, daß sogar der Effekt der radioaktiven Markierung, der mit einer ande-

ren Elektronenverteilung einhergeht, vom Antikörper erkannt wird. Es ist jedoch zu berücksichtigen, daß die Dissoziationsgeschwindigkeit des markierten E2 ohne Sequentialinkubation gemessen wurde (Teil I). Die beobachtete Differenz der Dissoziationsgeschwindigkeiten kann also auch durch die Unterschiede der Meßmethode verursacht worden sein.

Vom E2-6-oxo (80 Minuten) über E2-6-cmo (180 Minuten) steigt die Halbwertszeit bis zum E2-6-O-Me (200 Minuten) an. Dies läßt klar erkennen, daß Haptene mit dem Brückenglied besser gebunden werden als solche ohne die cmo-Gruppe.

Eine weitere Vergrößerung des Moleküls über das cmo-Glied hinaus zum Lysin-Derivat führte zu keinem weiteren Anstieg, sondern zu einem Abfall der Halbwertszeiten (E2-6-cmo-lys: 130 Minuten). Zur Erklärung dieses Effektes könnte man annehmen, daß die freie Carboxylgruppe des Lysin-Derivates die Affinität des Haptens zum Antikörper so weit abschwächt, daß die Steigerung der Komplexstabilität infolge der Vergrößerung der Kontaktregion durch die übrigen Strukturelemente des Lysins überkompensiert wird. Gestützt wird diese Deutung dadurch, daß E2-6-cmo, das ebenfalls eine freie Carboxylgruppe enthält, eine kürzere Halbwertszeit aufweist als E2-6-O-Me. Andererseits ist es jedoch unwahrscheinlich, daß polare Gruppen einen wesentlichen Einfluß auf Reaktionsenergien von Assoziationsreaktionen in wässrigen Lösungen ausüben, die im wesentlichen von apolaren Bin-

dungen verursacht werden. Außerdem ist zu bedenken, daß dem karboxylhaltigen Histidin-Derivat E2-6-cmo-his die im Immunogen enthaltene Lysin-Struktur fehlt. Trotzdem ist seine Affinität zum Antikörper eher stärker als die des Lysin-Derivates E2-6-cmo-lys. Im Einklang mit diesen Ergebnissen steht die zusammenfassende Deutung, daß die Antikörpermoleküle das Steroidgerüst und den C6-Substituenten erkennen, diesen jedoch nur bis zum $=N-O-(CH_2)-$ Glied. Es bleibt noch offen, ob das CH_2 -Glieder an der Bindung beteiligt ist, da eine $=N-O$ -Verbindung noch nicht geprüft werden konnte.

4.2.2 Einfluß der Reaktionstemperatur; Aktivierungsenergie der Dissoziation

Der Einfluß der Temperatur auf die Dissoziationsgeschwindigkeit der Östrogen-Anti-Östrogen-Antikörper-Komplexe ist beträchtlich (Teil I: Tab.5,6,7; Teil II: Tab.3). Die Dissoziationsgeschwindigkeiten des markierten Ostrons, Östradiols und Östriols waren bei 35°C 4 mal so groß wie bei 5°C. Die unmarkierten Haptene hatten bereits bei 25°C das 4- bis 5-fache der Dissoziationsgeschwindigkeit erreicht, die sie bei 5°C aufwiesen. Es muß offenbleiben, wie weit diese Differenz durch die Verschiedenheit der Meßmethoden bedingt ist. Bemerkenswert ist die Tatsache, daß bei gleicher Meßmethode für E2-6-oxo und E2-6-O-Me stärkere Temperaturabhängigkeit der Dissozia-

tionsgeschwindigkeit beobachtet wurde als für E2-6-cmo, E2-6-cmo-his und E2-6-cmo-lys. Die aus den Temperaturabhängigkeiten berechneten Aktivierungsenergien lagen zwischen 10 und 16 kcal/mol. Es muß allerdings darauf hingewiesen werden, daß für diese orientierenden Untersuchungen die Dissoziationsgeschwindigkeiten unmarkierter Haptene nur bei zwei Temperaturen gemessen wurden.

4.3 Vergleich mit Ergebnissen anderer Autoren

In Tab.4 sind die Dissoziationsgeschwindigkeiten einiger Hapten-Antikörper-Komplexe aufgeführt, in Tab.5 die Aktivierungsenergien der Dissoziation einiger Steroid-Protein-Komplexe.

Die in Tab.4 zusammengestellten Dissoziationsgeschwindigkeiten wurden in drei Gruppen eingeteilt: in Gruppe 1 werden sehr hohe Dissoziationsgeschwindigkeiten aufgeführt ($1,3 \times 10^3 - 50 \text{ sec}^{-1}$), in Gruppe 2 mittlere ($10 \times 10^{-4} - 1 \times 10^{-4} \text{ sec}^{-1}$) und in Gruppe 3 sehr niedrige Dissoziationsgeschwindigkeiten ($< 10^{-5} \text{ sec}^{-1}$).

Beim Vergleich der in den drei Gruppen aufgeführten Haptene und Antikörper fällt auf, daß zur ersten Gruppe nicht nur Immunkomplexe gezählt wurden, sondern auch Komplexe von Plasmazytom-Protein mit Dinitrophenyl-Derivaten, deren Assoziationsgleichgewichtskonstanten in niedrigen Bereichen liegen. Außerdem sind in dieser Gruppe Haptene aufgeführt, deren Molekulargewichte (un-

Gruppe 1

Antikörper	Hapten	$k_{21}(\text{sec}^{-1})$	Methode	Referenz
Anti-phenyl- arsonat	1-Naphthol-4-4-(4'- azobenzolazo)-phenyl- arsonsäure	50	Temperatursprung- Spektrophotometrie	Froese e.a. (8)
Anti-2,4-di- nitrophenyl	1-Hydroxy-4-(2,4-di- nitrophenylazo)-2,5- naphthalen-disulfonat	80	Temperatursprung- Spektrophotometrie	Froese (36)
Anti-2,4-di- nitrophenyl	1-Hydroxy-4-(4-phenyl- azo)-2,5-naphthalen- disulfonat	410		
Anti-2,4-di- nitrophenyl	1-Hydroxy-4-(2,4-di- nitrophenylazo)-2,5- naphthalen-disulfonat	76	Temperatursprung- Spektrophotometrie	Kelly e.a. (37)
MOPC 315	Dnp-Lysin Dnp-Glycin	53 $1,3 \times 10^3$	Temperatursprung- Fluorimetrie	Pecht e.a. (11)

Gruppe 2

Antikörper	Hapten	$k_{21}(\text{sec}^{-1})$	$T(^{\circ}\text{C})$	Methode	Referenz
Anti-E2-6-cmo	E2-17 β	$1,56 \times 10^{-4}$	0	Kompetition mit	Kahn e.a.
Anti-PGF _{2\alpha}	PGF _{2\alpha}	$2,90 \times 10^{-3}$	20	unmarkiertem Hapten	(24)
Anti-E1	E1	$0,97 \times 10^{-4}$	0		
		$6,80 \times 10^{-4}$	0		
Anti-E1-6-cmo	E1	$2,15 \times 10^{-4}$	5	Kompetition mit	diese Arbeit
Anti-E2-6-cmo	E2	$3,36 \times 10^{-4}$	5	unmarkiertem Hapten	
		$9,92 \times 10^{-4}$	25		
Anti-E3-6-cmo	E3	$2,33 \times 10^{-4}$	5		
Anti-E2-6-cmo	E2-6 β -OH	$11,55 \times 10^{-4}$	25	Sequentialinkubation	
	E2-6-oxo	$7,70 \times 10^{-4}$	25		
	E2-6-cmo	$1,92 \times 10^{-4}$	25		
	E2-6-O-Me	$2,88 \times 10^{-4}$	25		

Gruppe 2(Fortsetzung)

Antikörper	Hapten	$k_{21}(\text{sec}^{-1})$	$T(^{\circ}\text{C})$	Methode	Referenz
Anti-Digoxin	Digoxin	$1,9 \times 10^{-4}$	22	Adsorptionsmethode	Smith e.a.
Anti-Strophan-	Strophantidin	$1,5 \times 10^{-3}$	22	und im Vergleich	(18)
tin				Kompetition mit	
Anti-Digitoxin	Digitoxin	$2,3 \times 10^{-4}$	22	unmarkiertem Hapten	
Anti-Angioten-	Angiotensin II	$1,7 \times 10^{-4}$	4	Adsorptionsmethode	Rollerie e.a.
sin II					(27)

Gruppe 3

Antikörper	Hapten	$k_{21}(\text{sec}^{-1})$	$T(^{\circ}\text{C})$	Methode	Referenz
Anti-Insulin	Insulin	$6,47 \times 10^{-6}$	4	Kompetition mit	Zettner e.a.
		$2,04 \times 10^{-5}$	22	unmarkiertem Hapten	(5)

Tab.4 Vergleich von Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten k_{21}

gefähr 250-550 Dalton) es wahrscheinlich machen, daß ihre Kontaktregionen mit der bindenden Region der Antikörper kleiner sind als die Kontaktregionen der in den beiden anderen Gruppen aufgeführten Haptene. Die Molekulargewichte der Haptene der 2. Gruppe liegen zwischen Prostaglandin $F_{2\alpha}$ (353 Dalton) und Angiotensin (1032 Dalton). Die Unterschiede in den Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten von Prostaglandin, Steroiden und Angiotensin sind zu gering, um bei den unterschiedlichen Versuchsbedingungen auf strukturbedingte Einflüsse schließen zu können.

Trotzdem sei darauf hingewiesen, daß auch die von anderen Autoren angegebenen Dissoziationsgeschwindigkeiten nicht-substituierter Steroide im allgemeinen größer sind als die Dissoziationsgeschwindigkeiten solcher steroidaler Haptene, die neben dem Sterangerüst noch einen Teil des Brückengliedes enthalten wie die von uns untersuchten Östrogen-C6-Derivate und das von Smith und Skubitz (18) geprüfte Digoxin und Digitoxin. Eine Ausnahme stellt offenbar das Strophanthin dar, für das auch eine Gleichgewichtskonstante von 10^9 l mol^{-1} angegeben wurde (18), die sich von der für Digoxin und Digitoxin mit $10^{10} \text{ l mol}^{-1}$ unterscheidet. Von den Autoren wurde keine Erklärung dafür angegeben. Das Octapeptid Angiotensin II der Gruppe 2 leitet über zu den Polypeptiden der Gruppe 3. Bei der Diskussion der Stabilität von Komplexen der Substanzen dieser Gruppe ist zwischen Avidität und Af-

finität zu unterscheiden. Unter Avidität versteht man die Antikörperbindung ohne Berücksichtigung der Anzahl der assoziierten Antikörpermoleküle pro Molekül Antigen, während sich die Affinität auf die Bindung eines Antikörpers an die Immundeterminante bezieht. Nach den in der Einleitung zitierten Autoren (2,3) bindet die entsprechende Region eines Antikörpers etwa 6 Aminosäuren des Antigens. Die Dichte, mit der ein Antigen mit Antikörpern belegt werden kann, beträgt für Proteine mittlerer Größenordnung 4 bis 6 Antikörper. Demnach kann das Insulin-Molekül mit mehr als einem Antikörpermolekül assoziieren. Diese Ableitung stimmt mit bekannten Daten überein (38).

Zusammenfassend kann aus den Daten der Tab. 4 geschlossen werden, daß Antikörper-Komplexe mit Haptenen der Größe E2-6-O-Me und Digitoxin oder Digoxin die längste Halbwertszeit der einwertigen Haptene besitzen. Im Digitoxin und Digoxin ist das Brückenglied allerdings länger als im E2-6-O-Me. Vom Digoxigenin selbst liegen keine kinetischen Daten vor. Da aber die Gleichgewichtskonstanten von Digoxigenin und Digoxin sowie von Digitoxigenin und Digitoxin etwa gleich groß sind, kann man unter Vorbehalt schließen, daß in diesen Molekülen das Brückenglied keinen wesentlichen Beitrag zur Antikörperbindung leistet. Diese Befunde stehen also nicht im Widerspruch zu unserer Annahme, daß eine Molekülgröße vom Ausmaß des E2-6-O-Me ausreicht, um die gesamte Ausdehnung der bindenden Region des Antikörpers zu besetzen.

Bindungsprotein	Ligand	Akt.-Energie kcal/mol	Referenz
SBBG	Testosteron	15,8	Heyns e.a. (39)
	Dihydrotestosteron	16,8	
CBG	Cortisol	36,0	Stroupe e.a. (40)
Lebercytosol	Dexamethason	17,0	Koblinsky e.a. (41)
Eileitercytosol	Progesteron	23,0	Hansen e.a. (42)
Anti-E1-Antiserum	E1	12,4	diese Arbeit
Anti-E2-Antiserum	E2	10,1	
Anti-E3-Antiserum	E3	15,1	
Anti-E2-Antiserum	E2-6-oxo	15,8	
	E2-6-cmo	10,1	
	E2-6-O-Me	15,0	
	E2-6-cmo-lys	8,9	

Tab. 5 Vergleich von Aktivierungsenergien (SBBG Steroid-bindendes- β -Globulin, CBG Cortisol-bindendes Globulin).

Zu den Aktivierungsenergien waren wenige Vergleichswerte in der Literatur zu finden. Nach unseren Ergebnissen liegen die Aktivierungsenergien der Dissoziation von Östrogen-Anti-Östrogen-Antikörper-Komplexen in der gleichen Größenordnung wie die von Testosteron-SBBG-Komplexen

und Progesteron-Rezeptor-Komplexen. Die für Cortisol-CBG-Komplexe bestimmten Werte (40) liegen deutlich höher. Zur Erklärung wird angenommen, daß bei der Dissoziation dieser Komplexe Konfigurationsänderungen der bindenden Proteine stattfinden.

ZUSAMMENFASSUNG

In Teil I der vorliegenden Arbeit wurde die Dissoziationsgeschwindigkeit der Komplexe von markiertem Östron, Östradiol und Östriol mit korrespondierenden Antikörpern in einem Temperaturbereich von 5 - 35°C gemessen. Drei verschiedene Methoden, die Kompetitionsmethode mit unmarkiertem Hapten und nachfolgender B/F-Trennung mit Dextranskohle oder Ammoniumsulfat und die Adsorptionsmethode mit Dextranskohle, wurden miteinander verglichen. Dabei ergaben sich in den Ergebnissen keine Unterschiede zwischen den Trennungsmethoden.

In Teil II wurde die Dissoziationsgeschwindigkeit der Komplexe von C6-substituierten Östradiol-Derivaten mit Anti-Östradiol-Antikörpern mit der Technik der Sequentialinkubation bei 5 und 25°C bestimmt.

Die Dissoziation der Hapten-Antikörper-Komplexe zeigte eine ausgeprägte Temperaturabhängigkeit, die bei E2-6-oxo und E2-6-O-Me besonders stark war.

Die Halbwertszeit der markierten Komplexe betrug bei 5°C für Östron 54,5 Minuten, für Östradiol 34,5 Minuten und für Östriol 50 Minuten.

Die Halbwertszeit der unmarkierten Komplexe stieg bei 5°C mit der Größe des Hapten-Moleküls von E2 (45 Minuten) über E2-6-oxo (80 Minuten) bis zum E2-6-O-Me (200 Minuten) und nahm bei einer weiteren Vergrößerung des

Haptens (E2-6-cmo-his (180 Minuten), E2-6-cmo-lys (130 Minuten)) wieder etwas ab. Dieses Ergebnis wurde dahingehend gedeutet, daß das eigentliche Hapten für den Anti-Östradiol-C6-Konjugat-Antikörper größer als E2-6-oxo ist und maximal eine Größe von E2-6-O-Me besitzt.

LITERATUR

1. Blake, C.C.F.: Antibody structure and antigen binding. *Nature* 253, (1975) 158
2. Goodman, J.W.: Antigenic determinants and antibody combining sites. In: "The Antigens", Vol. III, 127-187 (Sela, M., Ed.) Academic Press, New York 1975
3. Lange, A., Zeiger, A.R., Maurer, P.H.: The immunochemistry of a linear polymer and a branched copolymer containing the sequence Glu-Lys-Ala-Gly. *Immunochemistry* 11, (1974) 549-554
4. Kuss, E., Goebel, R., Enderle, H.: Steroids as immunochemical probes I. Influence of oxo-, and/or hydroxy-groups at C-16/C-17 of estrogens on affinity to anti-estrone-, anti-estradiol-17 α - and anti-estradiol-17 β -antisera. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 354, (1973) 347-364
5. Zettner, A., Duly, P.E.: Principles of competitive binding assays (saturation analyses). II. Sequential saturation. *Clin. Chem.* 20, (1974) 5-14

6. Kuss, E., Dirr, W.: Unveröffentlichte Ergebnisse
7. Kuss, E.: Diskussionsbemerkung. J. Ster. Biochem. 5, (1974) 749
8. Froese, A., Sehon, A.H., Eigen, M.: Kinetic studies of protein-dye and antibody-hapten interactions with temperature-jump method. Can. J. Chem. 40, (1962) 1786-1795
9. Hunter, W.M.: Preparation and assessment of radioactive tracers. Brit. Med. Bull. 30, (1974) 18-23
10. Rodbard, D., Ruder, H.J., Vaitukaitis, J., Jacobs, H.S.: Mathematical analysis of kinetics of radioligand assays: Improved sensitivity obtained by delayed addition of labeled ligand. J. Clin. Endocrin. 32, (1971) 343-355
11. Pecht, I., Givol, D., Sela, M.: Dynamics of hapten-antibody interaction. Studies on a myeloma protein with anti-2,4-dinitrophenyl specificity. J. Mol. Biol. 68, (1972) 241-247
12. Kelly, K.A., Sehon, A.H., Froese, A.: Kinetic studies on antibody-hapten reactions. II.

- Reactions with antibodies and their polypeptide chains. Can. J. Biochem. 51, (1973) 1355-1364
13. Herbert, G.A., Pelham, P.L., Pittman, B.: Determination of the optimal ammonium sulfate concentration for the fractionation of rabbit, horse and goat antisera. Appl. Microbiol. 25, (1973) 26-36
14. Kuss, E., Goebel, R.: Determination of estrogens by radioimmunoassay with antibodies to estrogen-C6-conjugates; I. Synthesis of estrone-, estradiol-17 β -, and estriol-6-albumin-conjugates. Steroids 19, (1972) 509-518
15. Glasstone, S.: Textbook of physical chemistry. Macmillan and Co., London 1962
16. Menzinger, M., Wolfgang, R.L.: Bedeutung und Anwendung der Arrhenius-Aktivierungsenergie. Angew. Chemie 81, (1969) 446-452
17. Brdička, R.: Grundlagen der physikalischen Chemie. VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin 1967
18. Smith, T.W., Skubitz, K.M.: Kinetics of

interactions between antibodies and haptens.

Biochemistry 14, (1975) 1496-1502

19. Day, L.A., Sturtevant, J.M., Singer, S.J.: The kinetics of the reactions between antibodies to the 2,4-dinitrophenyl group and specific haptens. Ann. N.Y. Acad. Sci. 103, (1963) 611-625
20. Berson, S.A., Yalow, R.S.: Quantitative aspects of the reaction between insulin and insulin-binding antibody. J. clin. Invest. 38, (1956) 1996-2016
21. Milgrom, E., Baulieu, E.E.: A method for studying binding proteins, based upon differential dissociation of small ligand. Biochim. biophys. Acta 194, (1969) 602-605
22. Ratcliffe, J.G.: Separation techniques in saturation analysis. Brit. Med. Bull. 30, (1974) 32-38
23. Rodbard, D., Catt, K.J.: Mathematical theory of radioligand assays: The kinetics of separation of bound from free. J. Ster. Biochem. 2, (1972) 255-273

24. Kahn, D., Andrieu, J.M., Dray, F.: Evaluation of some binding parameters of hapten-antibody complexes using dextran-coated charcoal to separate the bound and free fractions. *Immunochemistry* 11, (1974) 327-332
25. Mortensen, E.: Separation of free and protein-bound ligand molecules by means of protein-coated charcoal. *Clin. Chem.* 20, (1974) 1146-1149
26. de Hertogh, R., van der Heyden, I., Ekka, E.: "Unbound" ligand adsorption on dextran-coated charcoal: practical considerations. *J. Ster. Biochem.* 6, (1975) 1333-1337
27. Rolleri, E., Malvano, R., Gandolfi, C., Rosa, U.: Effect of irreversible adsorbents on the dissociation of the antigen-antibody complexes. *Horm. Metab. Res.* 6, (1974) 57-61
28. Soppilä, I.J.T.: Disturbance of hapten-antibody equilibria by ammonium sulphate solutions. A source of error in antibody affinity determinations. *J. Immunol. Meth.* 2, (1975) 135-140

29. Kushinsky, S., Anderson, M.: Comparison of dextran-coated charcoal and ammonium sulfate in the radioimmunoassay of estrogens. *Steroids* 25, (1975) 145-150
30. Skubitz, K.M., Smith, T.W.: Determination of antibody-hapten association kinetics: A simplified experimental approach. *J. Immunol.* 114, (1975) 1369-1374
31. Weiler, J.J., Weiler, E., Dittrich, B., Sprenger, R.: Analysis of antibody populations to oligo-alanine determinants. II. Kinetic characterization of allotypic subpopulations. *Eur. J. Immunol.* 3, (1973) 348-359
32. Werblin, T.P., Young, T.A., Quagliata, F., Siskind, C.W.: Studies on the control of antibody synthesis. 3. Changes in heterogeneity of antibody affinity during the course of the immune response. *Immunology* 24, (1973) 477-492
33. Kahn, C.R., Freychot, P., Roth, J., Neville, D.M.: Quantitative aspects of the insulin-receptor interaction in liver plasma membranes. *J. Biol. Chem.* 249, (1974) 2249-2256

34. Rodbard,D.: Mathematics of hormone-receptor interaction. In: Advances in experimental medicine and biology. Vol.36, Receptors for reproductive hormones. 289-327 (O'Malley,B. W., Means,A.R., Ed.) Plenum Press, New York, London 1973
35. Goldenberg,K., Berkowitz,J.M., Praissman,M.: Methods in the quantitation of antigen-antibody reactions measured by radioimmunoassay: Application to the gastrin system revealing large and restricted binding energies. J. Immunol. 112, (1974) 1008-1018
36. Froese,A.: Kinetic and equilibrium studies on 2,4-dinitrophenyl hapten-antibody systems. Immunochemistry 5, (1968) 253-264
37. Kelly,K.A., Sehon,A.H., Froese,A.: Kinetic studies on antibody-hapten reactions. I. Reactions with antibodies and their univalent Fab' fragments. Immunochemistry 8, (1971) 613-625
38. Steffen,C.: Allgemeine und experimentelle Immunologie und Immunpathologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1968

39. Heyns, W., de Moor, P.: Kinetics of dissociation of 17 β -hydroxysteroids from the steroid binding β -globulin of human plasma. J. Clin. Endocrin. 32, (1971) 147-154
40. Stroupe, S.D., Westphal, U.: Steroid-protein-interactions. Stopped flow fluorescence studies of the interaction between steroid hormones and progesterone-binding globulin. J. Biol. Chem. 250, (1975) 8735-8739
41. Koblinsky, M., Beato, M., Kalimi, M., Fedgelson, P.: Glucocorticoid-binding proteins of rat liver cytosol. II. Physical characterization and properties of the binding proteins. J. Biol. Chem. 247, (1972) 7897-7904
42. Hansen, P.E., Johnson, A., Schrader, W.T., O'Malley, B.W.: Kinetics of progesterone binding to the chick oviduct receptor protein. J. Ster. Biochem. 7, (1976) 723-732

ANHANG

$^3\text{H-E1}$	(pg/Ansatz)	T (°C)	5	15	25
Anti-E1-AS H2					
20			0,578	1,153	2,099
200			0,609	1,145	2,111
600			0,567	1,204	2,189
Anti-E1-G H2					
20			0,575	1,207	2,174
200			0,564	1,133	2,168
Anti-E1-AS I2					
20			0,518	1,119	2,237
200			0,562	1,117	2,395
600			0,569	1,180	2,312
Anti-E1-G I2					
20			0,554	1,264	2,254
200			0,538	1,231	2,327
Anti-E1-AS K2					
200			0,559	1,143	2,250
Anti-E1-G K2					
200			0,558	1,205	2,305

Tab.1 Bindung von ^3H -Östron ($^3\text{H-E1}$) durch Anti-Östron-C6-Konjugat-Antiseren. Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten $k_{21} \times 10^2 \text{ (min}^{-1}\text{)}$ ermittelt durch Kompetitionsmethode mit Kohletrennung.

$^3\text{H-E2}$	(pg/Ansatz)	T (°C)	5	15	25	35
Anti-E2-AS E2						
20			0,935	1,740	2,728	3,222
200			0,874	1,752	2,615	3,084
600			0,944	1,713	2,594	3,234
Anti-E2-G E2						
20			0,900	1,821	2,704	3,112
200			0,944	1,699	2,672	3,299
600			0,924	1,664	2,617	3,246
Anti-E2-AS D2						
200			0,869	1,484	2,493	
Anti-E2-G D2						
200			0,851	1,447	2,458	
Anti-E2-AS F2						
200			0,854	1,478	2,395	
Anti-E2-G F2						
200			0,857	1,487	2,597	

Tab.2 Bindung von ^3H -Östradiol ($^3\text{H-E2}$) durch Anti-Östradiol-C6-Konjugat-Antiseren. Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten $k_{21} \times 10^2 \times 10^2 \text{ (min}^{-1}\text{)}$ ermittelt durch Kompetitions-methode mit Kohletrennung.

³ H-E3 (pg/Ansatz)	T (°C)	5	15	25
Anti-E3-AS K2				
20		0,605	1,265	2,589
200		0,506	1,290	2,696
600		0,621	1,247	2,743
Anti-E3-G K2				
20		0,577	1,576	2,636
200		0,599	1,281	2,626
Anti-E3-AS I2				
20		0,624	1,186	2,609
200		0,562	1,139	2,552
600		0,606	1,186	2,572
Anti-E3-G I2				
20		0,609	1,048	2,693
200		0,587	1,165	2,626
Anti-E3-AS H2				
200		0,620	1,183	2,574
Anti-E3-G H2				
200		0,579	1,206	2,666

Tab. 3 Bindung von ³H-Ostriol (³H-E3) durch Anti-Ostriol-C6-Konjugat-Antiseren. Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten $k_{21} \times 10^2 \times 10^2$ (min⁻¹) ermittelt durch Kompetitiionsmethode mit Kohletrennung.

$^3\text{H-EZ} = 200 \text{ } \mu\text{R}/\text{Anmerk.}$
 $\text{Ti} = 15^{00}$
 Ant. I-EZ-AB-EZ
 $0,5510$
 Ant. I-EZ-AB-EZ
 $0,5770$
 Ant. I-EZ-AB-EZ
 $0,5530$
 $^3\text{H-EZ} = 200 \text{ } \mu\text{R}/\text{Anmerk.}$
 $\text{Ti} = 15^{00}$
 Ant. I-EZ-AB-EZ
 $1,650$
 Ant. I-EZ-AB-EZ
 $1,731$

Tab. 4: Bindung von ^3H -Glycerol ($^3\text{H-EZ}$) durch Anti-Glycerol-Cellulosepapier. Die Werte sind die schwachstelektronenanteile $\text{EZ} \times 100 \times 10^2 \text{ (min}^{-1}\text{)}$ ermittelt durch Komplexfotometrie mit Ammonium-sulfatlösung.

 $^3\text{H-EZ} = 200 \text{ } \mu\text{R}/\text{Anmerk.}$
 $\text{Ti} = 15^{00}$
 Ant. I-EZ-AB-EZ
 $0,800$
 Ant. I-EZ-AB-EZ
 $0,800$
 Ant. I-EZ-AB-EZ
 $0,800$
 $^3\text{H-EZ} = 200 \text{ } \mu\text{R}/\text{Anmerk.}$
 $\text{Ti} = 15^{00}$
 Ant. I-EZ-AB-EZ
 $1,611$
 Ant. I-EZ-AB-EZ
 $1,727$

Tab.5 Bindung von ^3H -Östradiol (^3H -E2) durch Anti-Östradiol-C6-Konjugat-Antiseren. Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten $k_{21} \times 10^2 \text{ (min}^{-1}\text{)}$ ermittelt durch Adsorptionsmethode.

a) Temperatur: 5°C

Anti-E2-AS D2

E2-6 β -OH

0/100, 2,5/93, 12,5/72, 17,5/66, 27/51, 32,5/45,
40/36, 65/20, 80/13, 110/7, 145/3

E2-6 α -OH

0/100, 2,5/95, 15/75, 35/49, 50/36, 55/34, 90/16,
140/7

E2 unmarkiert

0/100, 2/98, 30/60, 50/44, 60/40, 70/32, 80/28,
85/26, 90/24, 105/19, 120/16

E2-6-oxo

0/100, 10/92, 35/74, 50/64, 60/59, 65/57, 70/53,
110/41, 120/34, 270/11

E2-6-O-Me

0/100, 5/99, 25/92, 40/89, 45/88, 50/83, 90/73,
120/65, 150/60, 170/56

E2-6-cmo

0/100, 10/96, 50/83, 90/72, 100/69, 110/66, 120/61,
180/51, 250/37

E2-6-cmo-his

0/100, 5/99, 15/94, 17,5/93, 60/81, 65/78, 70/76,
80/73, 110/64, 210/45

E2-6-cmo-lys

0/100, 5/97, 30/87, 35/83, 40/81, 90/63, 110/56,
150/45, 210/32, 340/15

Anti-E2-AS E2

E2-6 β -OH

0/100, 5/91, 7,5/82, 10/80, 12,5/74, 20/61

E2-6 α -OH

0/100, 5/93, 20/68, 30/56, 80/20, 100/14, 120/9

E2 unmarkiert

0/100, 5/95, 50/48, 60/38, 70/33, 85/30, 105/23,
120/15, 135/8

E2-6-oxo

0/100, 5/96, 20/83, 22/81, 25/80, 42,5/69, 60/60,
70/55, 100/41, 180/50, 210/14

E2-6-O-Me

0/100, 15/96, 30/90, 50/85, 70/79, 130/63, 210/48,
300/33

E2-6-cmo

0/100, 5/98, 15/94, 45/85, 70/79, 90/72, 290/33,
360/22

E2-6-cmo-his

0/100, 20/93, 60/80, 80/74, 130/58, 180/49, 270/36

E2-6-cmo-lys

0/100, 5/96, 20/52, 25/88, 30/84, 60/72, 100/60,
150/44, 290/20

Anti-E2-AS F2

E2-60-OH

0/100, 5/89, 10/77, 20/60, 30/49, 60/25, 90/10,
120/6, 180/1,5

E2-6 α -OH

0/100, 5/90, 10/83, 20/66, 30/56, 50/38, 60/30,
90/15, 120/8, 180/3

E2 unmarkiert

0/100, 5/92, 10/84, 20/74, 30/62, 40/53, 60/40,
90/26, 120/13, 180/6

E2-6-oxo

0/100, 10/92, 12,5/86, 30/76, 60/62, 90/43, 120/36,
180/21

E2-6-O-Me

0/100, 10/98, 20/94, 30/90, 60/82, 80/76, 150/59,
180/54, 240/44, 360/28

E2-6-cmo

0/100, 10/96, 30/89, 60/81, 90/70, 120/63, 150/55,
180/49, 240/41, 360/25

E2-6-cmo-his

0/100, 10/96, 20/90, 30/88, 60/81, 90/72, 180/51,
240/36, 300/31, 360/25

E2-6-cmo-lys

0/100, 10/93, 20/90, 30/86, 60/71, 120/50, 180/35,
240/26, 300/21

b) Temperatur 25°C

Anti-E2-AS E2

E2-6β-OH

0/100, 2,5/86, 20/25, 22/23, 35/9, 36,5/8, 45/5,
57,5/2

E2-6-oxo

0/100, 10/64, 15/48, 20/41, 25/34, 27,5/29, 30/26,
40/17, 42,5/15, 50/9

E2-6-O-Me

0/100, 2,5/93, 10/84, 37,5/52, 45/47, 52,5/41,
55/38, 100/19, 110/16, 130/8, 140/7

E2-6-cmo

0/100, 5/94, 25/77, 27,5/73, 35/65, 57,5/51, 100/33,
105/31, 135/21, 150/18, 220/9

E2-6-cmo-his

0/100, 7,5/92, 10/89, 15/86, 30/73, 40/66, 60/55,
90/39, 160/20

E2-6-cmo-lys

0/100, 2,5/98, 7,5/90, 15/83, 20/76, 22,5/71, 35/66,
70/41, 100/27

Tab.6 Abfall von PQ mit fortschreitender Dissoziationszeit bei 5°C (a) und 25°C (b). Angegeben ist das Zahlenpaar a/b, wobei a die Dissoziationszeit in Minuten und b PQ in Prozent des Ausgangswertes zum Zeitpunkt $t = 0$ angibt.

DANKVERMERK

Herrn Prof. Dr. Dr. Erich Kuss bin ich für die Über-
lassung des Themas, für die wissenschaftliche Anlei-
tung, sowie für die großzügigen Arbeitsmöglichkeiten
in seinem Labor zu Dank verpflichtet.

Herrn Dr. Hans Thoma danke ich für zahlreiche Rat-
schläge.

LEBENS LAUF

Harald Hötzing er

geb. am 7.8.1952 in Mühldorf
als Sohn des Malers Karl
Hötzing er und seiner Ehefrau
Katharina Hötzing er, geb.
Prummer

Schulbildung

Volksschule Salmanskirchen
von 1958 bis 1962
Ruperti-Gymnasium Mühldorf
von 1962 bis 1971
Abschluß: Reifezeugnis 1971

Studium

Ludwig-Maximilians-Universität
München
Studium der Medizin
von 1971 bis 1977 (12 Sem.)
ECFMG Examination Jan.1977
Abschluß: Staatsexamen Okt.1977
Studium der Philosophie und
Geschichte seit 1974

